



**PERBEDAAN EFEK PAPARAN DIVINE KRETEK DAN
KRETEK BIASA TERHADAP INDEKS APOPTOSIS DAN
PERUBAHAN HISTOPATOLOGI PADA KARSINOGENESIS
NASOFARING MENCIT C3H YANG DIINDUKSI
FORMALDEHYDE**

**LAPORAN HASIL PENELITIAN
KARYA TULIS ILMIAH**

**Diajukan sebagai syarat untuk mengikuti ujian hasil Karya Tulis Ilmiah
mahasiswa Program Strata-1 Kedokteran Umum**

**NIKEN MARETASARI PUTRI ATMODOJO
G2A008124**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
2012**

LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN HASIL KTI

**PERBEDAAN EFEK PAPARAN DIVINE KRETEK DAN KRETEK BIASA
TERHADAP INDEKS APOPTOSIS DAN PERUBAHAN
HISTOPATOLOGI PADA KARSINOGENESIS NASOFARING MENCIT
C3H YANG DIINDUKSI FORMALDEHYDE**

Disusun oleh:

**NIKEN MARETASARI PUTRI ATMODOJO
G2A008124**

Telah disetujui

Semarang, 1 Agustus 2012

Penguji

Pembimbing

**Prof. Dr. dr. Suprihati, M.Sc, Sp. THT-KL (K)
19500621 197703 2 001**

**dr. Awal Prasetyo, M.Kes, Sp.THT-KL
19671002 199702 1 001**

Ketua Penguji

**dr. Fanti Saktini, M.Si, Med
198103242010122001**

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan ini,

Nama : Niken Maretasari Putri Atmodjo

NIM : G2A008124

Alamat : Jl Gergaji IV/1119, Semarang

Mahasiswa : Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Fakultas kedokteran
UNDIP Semarang.

Dengan ini menyatakan bahwa,

- (a) Karya tulis ilmiah saya ini adalah asli dan belum pernah dipublikasi atau diajukan untuk mendapatkan gelar akademik di Universitas Diponegoro maupun di perguruan tinggi lain.
- (b) Karya tulis ini adalah murni gagasan, rumusan dan penelitian saya sendiri, tanpa bantuan orang lain, kecuali pembimbing dan pihak lain sepengetahuan pembimbing.
- (c) Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dalam naskah dengan disebutkan nama pengarang dan judul buku aslinya serta dicantumkan dalam daftar pustaka.

Semarang, 7 Juli 2012

Yang membuat pernyataan,

Niken Maretasari Putri Atmodjo

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas Karya Tulis Ilmiah ini. Penulisan Karya Tulis Ilmiah ini dilakukan untuk memenuhi sebagian persyaratan guna mencapai derajat sarjana strata-1 kedokteran umum di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Penulis menyadari sangatlah sulit untuk menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sejak penyusunan proposal sampai dengan terselesaikannya laporan hasil Karya Tulis Ilmiah ini. Bersama ini penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Rektor Universitas Diponegoro Semarang yang telah memberi kesempatan kepada kami untuk menimba ilmu di Universitas Diponegoro Semarang.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang yang telah memberikan sarana dan prasarana kepada kami sehingga kami dapat menyelesaikan tugas ini dengan baik.
3. dr. Awal Prasetyo, M.Kes, Sp.THT-KL selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing kami dalam penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini.
4. Prof. Dr. dr. Sarjadi, Sp. PA (K) yang telah memberi dorongan dan saran dalam proses penyelesaian Karya Tulis Ilmiah ini.
5. dr. Udadi Sadhana, M. Kes, Sp. PA yang telah membantu dalam pembacaan prepatat.
6. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (Dirjen Dikti) yang telah membiayai penelitian ini sesuai dengan surat pengumuman PKM-P 2012 No : 0071/E5.3/KPM/2012
7. Ketua bagian Biokimia dan segenap staf, yang telah membantu penyediaan sarana dan prasarana penelitian ini.

8. Risa, Widi, Vetty, yang telah bekerjasama dalam pelaksanaan penelitian ini, serta staf Laboratorium Patologi Anatomi yang telah membantu dalam pemrosesan jaringan.
9. Orang tua tercinta serta segenap keluarga yang senantiasa memberikan dukungan moral maupun material.
10. Para sahabat yang selalu memberi dukungan dalam menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini.
11. Pihak lain yang tidak mungkin disebutkan satu-persatu atas bantuannya secara langsung maupun tidak langsung sehingga Karya Tulis Ilmiah ini dapat terselesaikan dengan baik.

Akhir kata, penulis berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga Karya Tulis Ilmiah ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Semarang, Juli 2012

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT.....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Permasalahan Penelitian	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4. Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1 Manfaat untuk Ilmu Pengetahuan.....	6
1.4.2 Manfaat untuk Penelitian.....	7
1.4.3 Manfaat untuk Pelayanan Kesehatan.....	7
1.4.4 Manfaat untuk Masyarakat	7
1.5. Keaslian Penelitian	8
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	12
2.1. Karsinoma Nasofaring.....	12
2.2. Induksi karsinogenesis Nasofaring dengan <i>Formaldehyde</i>	17
2.3. Perubahan Histopatologi Epitel Mukosa Nasofaring	21
2.4. Kompleksitas Sistem Sel dan Nanobiologi.....	24
2.5. Pengobatan KNF dengan Metode Pengasapan <i>Divine Kretek</i>	26

2.6. Indeks Apoptosis	28
BAB 3. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	31
3.1. Kerangka Teori	31
3.2. Kerangka Konsep.....	32
3.3. Hipotesis	32
BAB 4. METODE PENELITIAN.....	33
4.1. Ruang Lingkup Penelitian	33
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	33
4.3. Jenis dan Rancangan Penelitian.....	33
4.4. Sampel Penelitian	34
4.4.1 Sampel	34
4.4.1.1 Kriteria inklusi	34
4.4.1.2 Kriteria eksklusi	34
4.4.2 Besar sampel.....	34
4.5. Variabel Penelitian.....	35
4.5.1 Variabel bebas	35
4.5.2 Variabel tergantung	35
4.6. Definisi Operasional Variabel	35
4.7. Cara Pengumpulan Data	38
4.7.1 Bahan	38
4.7.2 Alat	38
4.7.3 Jenis Data.....	39
4.7.4 Cara Kerja.....	39
4.8. Alur Penelitian.....	42
4.9. Analisis Data	43
4.10. Etika Penelitian.....	43
4.11. Jadwal Penelitian	44
BAB 5. HASIL PENELITIAN	45
BAB 6. PEMBAHASAN.....	51
BAB 7. SIMPULAN DAN SARAN	56
7.1 Simpulan.....	56

7.2	Saran	56
	DAFTAR PUSTAKA	57
	LAMPIRAN	64

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Keaslian penelitian.....	8
Tabel 2. Klasifikasi grading dan staging KNF.....	16
Tabel 3. Klasifikasi pembesaran limfonodi	16
Tabel 4. Klasifikasi metastasis KNF	17
Tabel 5. Data grading dan staging berdasarkan AJCC ...	17
Tabel 6. Skor perubahan histopatologi.....	37
Tabel 7. Jadwal penelitian.....	44
Tabel 8. Skor histopatologi epitel mukosa nasofaring.....	46
Tabel 9. Nilai mean dan median skor histopatologi.....	47
Tabel 10. Uji kruskal wallis skor histopatologi epitel nasofaring.....	48
Tabel 11. Uji post hoc mann whitney	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Skema patomekanisme karsinogenesis nasofaring	23
Gambar 2. Nanostruktur <i>divine</i> kretek	27
Gambar 3. Apoptotic body	30
Gambar 4. Kerangka teori	31
Gambar 5. Kerangka konsep	32
Gambar 6. Alur penelitian	42
Gambar 7. Epitel nasofaring normal	49
Gambar 8. Epitel nasofaring displasia ringan	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian	64
Lampiran 2. Ethical Clearance	66
Lampiran 3. Output SPSS	67
Lampiran 4. Biodata Mahasiswa.....	71

DAFTAR SINGKATAN

AJCC	: American Joint Committee on Cancer
CD	: Cluster of Differentiation
CTL	: Cytotoxic T Lymphocytes
CT-Scan	: Computed Tomography Scan
DNA	: Deoxyribo Nucleic Acid
EPA	: Environmental Protection Agency
FADD	: Fat Associated Death Domain
FLICE	: FADD Like IL 1 Converting Enzyme
HE	: Hematoxylin Eosin
KNF	: Karsinoma Nasofaring
MRI	: Magnetic Resonance Imaging
NK	: Natural Killer
ppm	: part per million
RNA	: Ribo Nucleic Acid
WHO	: World Health Organization

**PERBEDAAN EFEK PAPARAN DIVINE KRETEK DAN
KRETEK BIASA TERHADAP INDEKS APOPTOSIS DAN
PERUBAHAN HISTOPATOLOGI PADA KARSINOGENESIS
NASOFARING MENCIT C3H YANG DIINDUKSI
FORMALDEHYDE**

Niken Maretasari PA¹, Awal Prasetyo²

ABSTRAK

Latar Belakang: Nanobiologi memiliki potensi yang cukup besar untuk pengobatan kanker. Salah satu produk yang menggunakan prinsip nanobiologi di Indonesia adalah *divine* kretek. *Divine* kretek merupakan rokok sehat yang berisi nanostruktur yang kompleks yang dapat menghantarkan elektron sampai ke level milivolt. Nanostruktur dalam *divine* kretek ini dapat memberi energi dan elektron pada sel sakit untuk mendorong perbaikan diri menjadi sel sehat dan untuk mengoptimalkan diri.

Tujuan: Membuktikan dan membandingkan potensi preventif dan kuratif *divine* kretek dalam proses karsinogenesis nasofaring (meliputi indeks apoptosis dan perubahan histopatologi) pada mencit C3H.

Metode: Penelitian eksperimental dengan *post test only control group design*, menggunakan 32 ekor mencit strain C3H. Mencit dibagi menjadi empat kelompok, kelompok K1 diinduksi formalin dan diberi paparan asap rokok kretek biasa selama 18 minggu; kelompok K2 diinduksi formalin, dilanjutkan pemaparan asap rokok kretek biasa selama 9 minggu berikutnya; kelompok P1 diinduksi formalin dan diberi paparan asap *divine* kretek selama 18 minggu; kelompok P2 diinduksi formalin, dilanjutkan pemaparan asap *divine* kretek selama 9 minggu berikutnya. Di akhir penelitian, nasofaring mencit diproses dan diperiksa, untuk dinilai kemudian dilihat proses karsinogenesisnya dinilai dari indeks apoptosis dan perubahan histopatologi.

Hasil: Uji Kruskal-Wallis terhadap variabel skor histopatologi epitel nasofaring dalam kelompok perlakuan diperoleh ($p=0,041$) atau bermakna ($p<0,05$). Uji Mann-Whitney antara kelompok K1 dan P1 ($p=0,014$) atau bermakna; kelompok K2 dan P2 ($p=0,513$) atau tidak berbeda; P1 dan P2 ($p=1$) atau tidak berbeda.

Kesimpulan: Paparan *divine* kretek selama dan sesudah induksi *formaldehyde* menimbulkan pengaruh berbeda bermakna pada perbaikan skor histopatologi epitel mukosa nasofaring mencit C3H. Efek preventif *divine* kretek lebih kuat daripada efek kuratifnya.

Kata kunci: *Divine* Kretek, formalin, indeks apoptosis, perubahan histopatologi.

¹ Mahasiswa program pendidikan S-1 kedokteran umum FK Undip

² Staf pengajar Bagian Patologi Anatomi FK Undip

**THE DIFFERENCE OF EFFECT BETWEEN DIVINE
CIGARETTE AND COMMON CIGARETTE TO APOPTOTIC
INDEX AND HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN
NASOPHARYNGEAL CARCINOGENESIS OF C3H MICE THAT
WERE INDUCED BY FORMALDEHYDE**

Niken Maretasari PA¹, Awal Prasetyo²

ABSTRACT

Background: Nanobiology has considerable potential for the treatment of cancer. One product that uses the principle of nanobiology in Indonesia is divine cigarette. Divine cigarette is healthy cigarette contains complex nanostructures that can conduct electrons up to the level of millivolts. Divine cigarettes's nanostructures can give energy and electrons in the diseased cells to promote self-improvement into healthy cells and to optimize themselves.

Aim: This study was aimed to prove and compare curative and preventive potency of divine cigarette in nasopharyngeal cancer (based on apoptotic index and histopathological changes) on C3H mice.

Methods: This was a laboratory study with post test only controlled group design, using 32 C3H mice as sample, divided into four groups; Control group 1 (K1) was exposed to formaline, and smoke of standard cigarette for 18 weeks; Control group 2 (K2) was exposed to formaline for nine weeks then followed with exposure of standard cigarette smoke for nine weeks; Treatment P1 group was exposed to formaline, and smoke of divine cigarette for 18 weeks; Treatment P2 group was exposed to formaline for nine weeks then followed with exposure of standard cigarette smoke for nine weeks. In the end of the research, nasopharyng tissue was processed and examined to determine the apoptotic index and the histopathological changes.

Result: The Kruskal-Wallis test for nasopharyngeal epithelium histopathology score variables in the treatment group obtained ($p = 0.041$) or significantly different ($p < 0.05$). The Mann-Whitney test between groups K1 and P1 ($p = 0.014$) or significant; group K2 and P2 ($p = 0.513$) or was not different; P1 and P2 ($p = 1$) were also not different.

Conclusion: The divine cigarette exposure that given during and after formaldehyde induction effected significantly on improvement of the histopathological score of C3H mice. The preventive effect of divine cigarette was stronger than curative one.

Keywords: Divine cigarette, formaline, apoptotic index, histopathological changes.

^{1.} Undergraduate Student of Medical Faculty Diponegoro University

^{2.} Teaching Staff of Pathological Anatomy Department of Medical Faculty Diponegoro University

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Kanker adalah salah satu penyakit yang menimbulkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi bagi umat manusia. Karsinoma Nasofaring (KNF) merupakan kanker yang bersifat invasif dan sering bermetastasis ke organ tubuh lainnya. Kanker ini lebih sering tumbuh pada *Fossa rosenmuller*, daerah di dinding lateral nasofaring dimana epitel kuboid berubah menjadi epitel skuamosa.¹

Di dunia insidensi KNF masih tinggi, sekitar 55,2% diantara seluruh keganasan di bidang THT. Diantara tumor ganas yang berasal atau terdapat di nasofaring, jenis KNF merupakan yang terbanyak (90-97%). Di Indonesia angka kejadian KNF juga cukup tinggi yakni sekitar 4,2 kasus baru per tahun per 100.000 penduduk.² Catatan dari berbagai rumah sakit menunjukkan bahwa kanker ini menduduki urutan keempat setelah kanker leher rahim, kanker payudara, dan kanker kulit. Insiden meningkat setelah usia 30 tahun dan mencapai puncak pada usia 40-60 tahun.³ Di negara – negara lain insidensi KNF termasuk bervariasi walaupun secara keseluruhan insidensinya terus meningkat dari tahun ke tahun. Insidensi KNF yang tinggi terdapat di Cina Selatan yaitu antara 25-50 kasus per 100.000 penduduk per

tahun.⁴ Di Eropa dan Amerika Utara , insidensi KNF termasuk jarang yaitu kurang dari 1 kasus per 100.000 penduduk per tahun.⁵ KNF menempati urutan pertama dari semua tumor ganas primer pada laki-laki dan urutan ke delapan pada perempuan.⁶

Berdasarkan diferensiasi sel, World Health Organization (WHO) menggolongkan KNF menjadi tiga kriteria, yaitu WHO tipe 1 (karsinoma sel skuamosa berkeratinisasi), WHO tipe 2 (karsinoma tidak berkeratinisasi), WHO tipe 3 (karsinoma berdiferensiasi buruk atau tidak berdiferensiasi). Berdasarkan data – data yang telah ada, KNF WHO tipe 3 mempunyai prosentase yang paling tinggi diantara dua tipe lainnya. Penelitian terdahulu di RSUP Dr. Kariadi Semarang pada tahun 2001 – 2005 menunjukkan bahwa rasio insidensi kanker kepala leher pada pria terhadap wanita adalah sebesar 5 : 4 dengan insidensi tertinggi kanker kepala leher terjadi pada rentang usia 40-49 tahun dan karsinoma epidermoid nasofaring WHO tipe 3 adalah yang paling sering ditemukan.⁷

Etiologi KNF bersifat multifaktorial. Berbagai faktor risiko seperti bahan karsinogen telah dipercaya dapat menyebabkan terjadinya KNF. Salah satu bahan karsinogen tersebut adalah *formaldehyde*. Penelitian yang dilakukan oleh Conolly pada tahun 2003 terbukti bahwa *formaldehyde* dapat menyebabkan terjadinya karsinoma sel skuamosa pada mukosa nasofaring tikus F344. Penelitian tersebut dilakukan dengan cara memberi uap *formaldehyde* secara kronik selama 6 minggu pada tikus F344 hingga terjadi karsinoma sel skuamosa. Efek karsinogenesis *formaldehyde* berasal dari sifatnya yang korosif terhadap mukosa sehingga bila dihirup terus – menerus dapat menimbulkan nekrosis hebat di daerah nasofaring dan

kavum nasi. *Formaldehyde* juga memicu terjadinya mutasi DNA. Gugus CO dalam *formaldehyde* bereaksi dengan gugus amina pada protein sehingga menghasilkan metenamin atau heksametilentetramin yang kemudian bereaksi dengan DNA dalam tubuh.⁸

Terapi untuk KNF masih sangat terbatas. Di daerah kepala dan leher reseksi bedah dibatasi oleh beberapa struktur penting yang berdekatan seperti mata, arteri karotis dan otak. Sisa kanker juga dapat tertinggal di dekat struktur vital atau bahkan menyebar ke luar margin bedah. Terapi radiasi memiliki tingkat kegagalan yang tinggi untuk tumor stadium lanjut, selain itu karena toksisitas yang dimilikinya, jumlah dosis yang diberikan pada terapi radiasi harus dibatasi. Sedangkan kemoterapi pada kanker kepala dan leher memiliki peran terbatas pada kombinasi dengan radioterapi.⁹ Berdasarkan hal – hal tersebut maka dibutuhkan model terapi baru untuk mencapai penyembuhan yang optimal.

Nanobiologi merupakan disiplin ilmu baru yang dapat merevolusi dunia kesehatan. Metode ini memiliki potensi yang cukup besar untuk pengobatan kanker yang dapat digunakan oleh para dokter. Nanobiologi menggabungkan alat, ide dan bahan nanosains biologi untuk menangani masalah – masalah biologi yang dapat diselesaikan dengan nanoteknologi. Cara nanobiologi bekerja adalah dengan membangun perangkat molekul dan berupaya untuk membangun mesin molekuler yang memanfaatkan konsep alam.^{10&11}

Molekul – molekul dalam nanobiologi berukuran 1 – 100 nm sebagai contohnya ribosom, enzim, DNA, dan lain – lain. Unit – unit ini pada umumnya

berupa makromolekul. Mereka merupakan susunan kompleks yang tersusun dari beberapa komponen monomer. Mereka bekerja sangat spesifik bahkan dianggap memiliki kecerdasan karena tahu kapan, bagaimana, dimana dan dengan siapa mereka harus bekerja.¹¹

Divine kretek adalah salah satu produk yang menggunakan prinsip nanobiologi. *Divine* kretek merupakan hasil konversi teknologi dari rokok yang mengandung radikal bebas menjadi rokok sehat yang berisi nanostruktur yang kompleks yang dapat menghantarkan elektron sampai ke level milivolt.¹² Asap rokok biasa mengandung komponen - komponen yang beracun seperti Hg, NH₃, CO, CO₂, NO, NO₂, dan lain – lain. Pada *divine* kretek, komponen – komponen beracun ini diubah menjadi komponen dengan ukuran yang sangat kecil (berukuran nano) yang memiliki energi yang potensial yang dapat menciptakan struktur kompleks yang lebih ramah bagi lingkungan dan manusia.¹³ Dalam partikel – partikel nano dalam *divine* kretek ini juga terkandung suatu *scavenger* yaitu suatu pembawa radikal bebas dalam tubuh. Adanya *scavenger* ini menyebabkan partikel – partikel nano tersebut dapat mengikat dan membuang radikal bebas di dalam dan luar sel sehingga tubuh menjadi lebih bersih. Kemudian partikel nano dapat memberi energi dan elektron pada sel sakit untuk mendorong perbaikan diri sel sehat, untuk mengoptimalkan diri.¹⁴ Karena berbagai kelebihan tersebut maka *divine* kretek patut diujicobakan sebagai metode pengobatan baru dalam terapi KNF.

Hasil penelitian ini nantinya akan dilihat pada efek preventif atau kuratif dari *divine* kretek melalui indeks apoptosis dan perubahan histopatologi epitel nasofaring

mencit C3H. Efek preventif dari *divine* kretek diperankan oleh *scavenger* yang dapat menangkap radikal bebas dalam tubuh sehingga *scavenger* ini dapat mencegah proses karsinogenesis di dalam tubuh.¹⁵ Efek kuratif dari *divine* kretek disebabkan karena partikel nano dalam *divine* kretek dapat memberi energi dan elektron pada sel sakit untuk dapat mengoptimalkan diri menjadi sel sehat.¹⁴ Sesuai dengan penelitian – penelitian sebelumnya yang mencoba mengujicobakan suatu zat yang berpotensi sebagai anti kanker, maka hasil penelitian dengan *divine* kretek ini diharapkan dapat meningkatkan indeks apoptosis dan membuat perubahan histopatologi epitel nasofaring menjadi lebih baik.^{3&16}

Penelitian sebelumnya yang mencoba mengujicobakan nanobiologi untuk terapi KNF belum pernah ada. Penelitian lain hanya menyebutkan bahwa *divine* kretek dengan metode balur dapat menyembuhkan kanker hepar.¹² Oleh karena itu penelitian *divine* kretek sebagai terapi KNF ini merupakan penelitian pertama yang mengujicobakan nanobiologi sebagai terapi KNF.

1.2 Permasalahan Penelitian

Bagaimanakah efek paparan *divine* kretek terhadap indeks apoptosis dan perubahan histopatologi pada karsinogenesis nasofaring mencit C3H yang terpapar *formaldehyde*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Membuktikan perbedaan efek *divine* kretek terhadap karsinogenesis nasofaring mencit C3H yang terpapar *formaldehyde* yang dibandingkan dengan rokok kretek biasa dengan menilai indeks apoptosis dan perubahan histopatologi melalui pengecatan HE.

1.3.2. Tujuan Khusus

- 1) Membuktikan efek *divine* kretek terhadap indeks apoptosis dan perubahan histopatologi pada karsinogenesis nasofaring mencit C3H selama diinduksi *formaldehyde*.
- 2) Membuktikan efek *divine* kretek terhadap indeks apoptosis dan perubahan histopatologi pada karsinogenesis nasofaring mencit C3H setelah diinduksi *formaldehyde*.
- 3) Membuktikan perbedaan efek *divine* kretek terhadap indeks apoptosis dan perubahan histopatologi pada karsinogenesis nasofaring mencit C3H selama dan setelah diinduksi *formaldehyde*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat untuk Ilmu Pengetahuan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperkaya penelitian / pengetahuan di bidang THT dengan memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat mengenai *divine* kretek sebagai model terapi baru untuk KNF.

1.4.2 Manfaat untuk Penelitian

Hasil Penelitian ini diharapkan dapat menjadi data atau sumber yang diperlukan bagi penelitian lain atau penelitian lanjutan.

1.4.3 Manfaat untuk Pelayanan Kesehatan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi landasan dalam pengembangan dan pemanfaatan *divine* kretek sebagai produk nanobiologi terutama dalam penanganan KNF.

1.4.4 Manfaat untuk Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi suatu inovasi atau memberikan suatu ide baru bagi masyarakat dalam hal merokok karena dengan tersedianya *divine* kretek di Indonesia ini diharapkan masyarakat menjadi lebih sehat dengan merokok dengan menggunakan *divine* kretek.

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1. Keaslian Penelitian

No	Peneliti	Judul	Metode	Hasil
1	Ivan H. El – Sayed	Nanotechnology in Head and Neck Cancer : The Race Is On. Dalam jurnal Curr Oncol Rep, tahun 2010, volume 12, halaman 121-128.	Penelitian eksperimental pada mencit secara in vivo. Mencit diinduksi dengan sel kanker kepala dan leher lalu diterapi dengan nanopartikel emas dan radiasi dengan tehnik fototermal. Hasil terapi dibandingkan dengan mencit yang hanya diterapi radiasi.	Mencit yang diterapi dengan nanopartikel emas dan fototermal memiliki 1 year survival rate yang lebih tinggi daripada mencit yang hanya diterapi dengan radiasi.
2	Sumitro B.S., dkk	<i>Overcoming Cigarette for Health without Altering the Flavor.</i> Malang: Universitas Brawijaya.	Penelitian eksperimental dengan melakukan paparan asap <i>divine</i> kretek pada tikus dan mencit	Berat badan tikus dan mencit yang dipapar asap <i>divine</i> lebih stabil dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak diberi paparan asap <i>divine</i> .
3	Awal Prasetyo	Efek Benalu Teh	Penelitian eksperimental	Ekstrak <i>S. atropurpurea</i>

dkk	(<i>Scurrulla Atropurpurea</i>) terhadap Karsinogenesis Nasofaring Mencit C3H yang Terpapar <i>Formaldehyde</i>	laboratorik dengan <i>thepost test only control group</i> design dengan 41 mencit C3H sebagai sampel. Variabel bebas : Efek Benalu Teh (<i>Scurrulla Atropurpurea</i>). Variabel tergantung : Karsinogenesis Nasofaring	sebelum dan sesudah induksi karsinogenesis menimbulkan pengaruh berbeda bermakna pada perbaikan skor histopatologi epitel mukosa nasofaring mencit C3H. Efek profilaksis <i>S. atropurpurea</i> lebih kuat daripada efek kuratif	
4	Hidayat Sulistyو	Inhibisi Aktivitas Proliferasi Sel dan Perubahan Histopatologi Epitelial Mukosa Nasofaring Mencit C3H dengan Pemberian Ektrak Benalu Teh. Semarang: Universitas; 2008.	<p>Penelitian eksperimental laboratorik dengan post test only control group design, menggunakan 15 mencit C3H sebagai sampel.</p> <p>Variabel bebas: benalu teh.</p> <p>Variabel tergantung: Aktivitas proliferasi sel dan Perubahan Histopatologi.</p>	Ekstrak <i>Scurrulla atropurpurea</i> sebelum dan sesudah induksi formalin menimbulkan pengaruh berbeda bermakna pada perbaikan skor histopatologi dan aktivitas proliferasi sel epitel mukosa nasofaring mencit C3H. Efek profilaksis <i>Scurrulla</i>

					atropurpurea lebih kuat daripada efek kuratif
5	A Purnama	Agung	Pengaruh Pemberian Echinacea Purpurea Terhadap Produksi Ifn- Γ Dan Indeks Apoptosis Sel Tumor Mencit Dengan Kanker Payudara Yang Mengalami Stres	Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan rancangan <i>The Post Test – Only Control Group Design</i> . Variabel bebas : Pemberian stressor berupa <i>electric foot shock</i> dan Pemberian ekstrak <i>Echinacea sp.</i> Variabel tergantung : Kadar IFN- γ dan Indeks apoptosis	<p>1. Terdapat perbedaan bermakna kadar IFN-γ mencit C3H dengan kanker payudara yang mendapat stres antara yang mendapat <i>Echinacea sp</i> dan yang tidak mendapat <i>Echinacea sp</i></p> <p>2. Terdapat perbedaan bermakna Indeks Apoptosis sel tumor mencit C3H dengan kanker payudara yang mendapat stres antara yang mendapat <i>Echinacea sp</i> dan yang tidak mendapat <i>Echinacea sp</i></p>

Penelitian Perbedaan Efek Paparan *Divine* Kretek dan Kretek Biasa Terhadap Indeks Apoptosis dan Perubahan Histopatologi pada Karsinogenesis Nasofaring Mencit C3H yang Diinduksi *Formaldehyde* ini belum pernah dilakukan

sebelumnya. Salah satu hal yang menyebabkan penelitian ini berbeda adalah variabel penelitian. Variabel bebas dari penelitian ini adalah paparan *divine* kretek dan paparan rokok kretek biasa, sedangkan variabel tergantung dari penelitian ini adalah indeks apoptosis dan perubahan histopatologi epitel mukosa nasofaring. Penelitian – penelitian yang telah ada sebelumnya hanya memuat salah satu dari variabel – variabel tersebut, sebagai contoh penelitian yang dilakukan oleh Sumitro BS hanya membahas mengenai masalah *divine* kretek dengan membandingkan berat badan mencit yang dipapar *divine* kretek dengan mencit yang tidak dipapar *divine* kretek tanpa adanya induksi kanker atau zat karsinogen lain, sedangkan penelitian ini mencoba menjelaskan efek *divine* kretek pada indeks apoptosis dan perubahan histopatologi karsinogenesis nasofaring mencit C3H yang diinduksi *formaldehyde*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karsinoma Nasofaring

Karsinoma Nasofaring (KNF) adalah tumor yang tumbuh dari sel – sel epitel yang menutupi dan melapisi permukaan nasofaring. Sekitar sepertiga dari KNF tipe tidak berdifferentiasi terdiagnosa pada remaja dan dewasa muda.¹⁷

KNF tumbuh di dinding lateral nasofaring, yaitu *Fossa Rosenmuller* yang merupakan daerah transisional dimana epitel kuboid berubah menjadi epitel skuamosa. Kanker ini menyebar ke area nasofaring, ke bagian lateral dari dinding nasofaring, lalu menyebar secara posterosuperior ke dasar tengkorak, palatum, hidung, dan orofaring. KNF dapat bermetastasis ke kelenjar getah bening leher. Metastasis jauh dapat terjadi ke tulang, mediastinum, paru-paru, dan dapat juga ke hati meskipun hal ini jarang terjadi.¹

Berdasarkan data registrasi kanker di Indonesia, KNF berada pada urutan keempat di antara semua keganasan yang ada pada tubuh manusia. Pada kelompok laki – laki, KNF berada pada peringkat kedua, sedangkan pada perempuan KNF berada pada peringkat kedelapan. KNF dapat dijumpai pada semua umur. Namun, paling banyak pada usia produktif yaitu 30 – 59 tahun. Insidensi KNF meningkat pada usia lebih dari 20 tahun dan jarang ditemukan pada usia di bawah 20 tahun. Di Indonesia, insidensi KNF diperkirakan sebesar 5 – 15 per 100.000 penduduk per tahun. Penelitian yang dilakukan oleh Chew pada

tahun 1997 menunjukkan bahwa KNF lebih sering ditemukan pada laki – laki dibanding perempuan dengan perbandingan 2-3:1.¹⁸

Insidensi KNF di berbagai negara sangat bervariasi. Di negara - negara barat, insidensi KNF kurang dari 1 per 100.000 penduduk per tahun. Sebagai contoh, insidensi KNF di Amerika Serikat pada pria dan wanita adalah sekitar 0,5 dan 0,2 per 100.000 penduduk per tahun.¹⁹ Penelitian yang dilakukan di Provinsi Guangdong dan daerah otonomi Guangxi, Cina Selatan menyebutkan bahwa insidensi KNF terjadi sangat tinggi, yaitu lebih dari 20 per 100.000 penduduk per tahun. Insidensi KNF meningkat pada usia di atas 30 tahun dan mencapai puncaknya pada usia 45 – 55 tahun.²⁰ Insiden tinggi juga dijumpai di Hongkong yaitu sekitar 15 – 30 per 100.000 penduduk per tahun. Pada ras – ras Asia Tenggara seperti Malaysia, Indonesia, Thailand, Vietnam, Filipina, insidensi KNF termasuk sedang, 5 – 15 per 100.000 penduduk per tahun.²¹

Etiologi dan faktor risiko KNF bersifat multifaktorial. Banyak faktor yang dapat mempengaruhi kemungkinan timbulnya tumor ini, seperti infeksi virus, letak geografis, ras, jenis kelamin, genetik, pekerjaan, lingkungan, kebiasaan hidup, kebudayaan, sosial ekonomi, infeksi kuman atau parasit, serta berbagai jenis bahan karsinogen. Salah satu bahan karsinogen yang dapat menimbulkan KNF yang dibahas dalam penelitian ini adalah *formaldehyde*.³

Seperti kanker pada umumnya, KNF juga memiliki gejala dan tanda tersendiri. Manifestasi klinis awal dari kanker nasofaring pada sebagian besar pasien adalah pembesaran kelenjar limfe leher. Diagnosis dapat ditegakkan melalui biopsi kelenjar limfe. Selain itu juga terdapat gejala lainnya. Gejala KNF

dapat dibagi dalam 4 kelompok, yaitu gejala nasofaring sendiri, gejala telinga, gejala mata dan saraf, serta metastasis atau gejala di leher. Gejala nasofaring berupa epistaksis ringan atau sumbatan hidung, dalam hal ini area nasofaring harus diperiksa dengan cermat, jika perlu menggunakan nasofaringoskop karena seringkali kanker ini bersifat asimtomatik atau dapat juga tumor tidak tampak karena masih terdapat di bawah mukosa (*creeping tumor*).²²

Gangguan pada telinga merupakan gejala dini yang timbul karena tumor berasal dari *Fossa Rosenmuller*, daerah dekat muara tuba eustachius. Gangguan ini dapat berupa tinnitus, rasa tidak nyaman di telinga hingga rasa nyeri di telinga (otolgia).²¹

Gangguan beberapa saraf otak merupakan gejala lanjut KNF. Hal ini disebabkan karena area nasofaring berhubungan dekat dengan beberapa lubang di dasar tengkorak. Penjalaran melalui foramen laserum akan menyebabkan lesi pada N.III, IV, VI, dapat pula mengenai N.V, sehingga tidak jarang timbul gejala diplopia. Neuralgia trigeminal merupakan gejala yang sering ditemukan oleh dokter saraf jika belum terdapat gejala lain yang signifikan.²¹

Proses lanjut dari KNF akan mengenai N. IX, X, XI, dan XII jika penjalaran terjadi melalui foramen jugulare. Gangguan – gangguan ini disebut sebagai sindrom Jackson. Jika gangguan tersebut telah mengenai seluruh saraf otak, maka gangguan tersebut disebut sebagai sindrom unilateral. Dapat pula disertai destruksi tulang tengkorak dan bila sudah terjadi demikian maka prognosisnya sangat buruk.²¹

WHO menggolongkan KNF menjadi tiga kriteria berdasarkan differensiasi selnya, yaitu WHO tipe 1 (karsinoma sel skuamosa berkeratinisasi), WHO tipe 2 (karsinoma tidak berkeratinisasi), WHO tipe 3 (karsinoma berdifferensiasi buruk atau tidak berdiferensiasi).²²

Diagnosis klinik kanker nasofaring mulanya didapatkan dari anamnesis dan gejala klinis tumor. Jika kecurigaan timbul, maka pemeriksaan dilanjutkan dengan menggunakan endoskopi untuk melihat kondisi mukosa nasofaring. Penonjolan mukosa, peradangan, dan ulseratif yang disertai perdarahan ringan merupakan tanda-tanda kondisi mukosa yang buruk dan curiga akan adanya kanker. Sebagai *gold standard* dilakukan diagnosis histopatologi spesimen biopsi nasofaring. Lebih lanjut lagi, dokter dapat juga melakukan pemeriksaan radiologik seperti MRI, CT-Scan dan Sinar X untuk melihat penyebaran kanker. Dari hasil pemeriksaan-pemeriksaan tersebut, dapat ditentukan tingkatan keganasan atau *grading* dan *staging* dari kanker tersebut. Klasifikasinya yang terbaru berdasarkan *Union Internationale Contre Cancer* (IUCC) tahun 2002, adalah sebagai berikut (Tabel 2, 3, dan 4)²²

Tabel 2. Klasifikasi Grading dan Staging KNF

Stadium T (ukuran / luas tumor)	Definisi
T0	Tak ada kanker di lokasi primer
T1	Tumor terletak / terbatas di daerah nasofaring
T2	Tumor meluas ke jaringan lunak orofaring dan atau ke kavum nasi
T2a	Perluasan tumor ke orofaring dan atau rongga hidung tanpa perluasan ke parafaring
T2b	Perluasan tumor ke orofaring dengan perluasan ke parafaring
T3	Tumor menginvasi struktur tulang dan / atau sinus paranasal
T4	Tumor meluas ke intrakranial, dan/atau melibatkan syaraf kranial, hipofaring, fossa infratemporal atau orbita

Tabel 3. Klasifikasi Pembesaran Limfonodi

Limfonodi Regional	Definisi
N	Pembesaran kelenjar getah bening regional
NX	Pembesaran kelenjar getah bening tidak dapat dinilai
N0	Tidak ada metastasis ke kelenjar getah bening regional
N1	Metastasis unilateral dengan nodus ≤ 6 cm di atas fossa supraklavikula
N2	Metastasis bilateral dengan nodus ≤ 6 cm, di atas fossa supraklavikula
N3	Metastasis nodus N3a > 6 cm N3b meluas sampai ke fossa supraklavikula

Tabel 4. Klasifikasi Metastasis KNF

Metastasis	Definisi
MX	Metastasis jauh tidak dapat dinilai
M0	Tidak ada metastasis jauh
M1	Metastasis jauh

Kemudian dari hasil *grading* dan *staging* tersebut dapat ditentukan stadium dari kanker pada tabel di bawah ini (Tabel 5).

Tabel 5. Data *Grading* dan *Staging* berdasarkan *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) 2002.^{22&24}

	T1	T2a	T2b	T3	T4
N0	I	IIA	IIB	III	IVA
N1	IIB	IIB	IIB	III	IVA
N2	III	III	III	III	IVA
N3	IVB	IVB	IVB	IVB	IVB
M1	IVB	IVB	IVB	IVB	IVB

2.2 Induksi Karsinogenesis Nasofaring dengan *Formaldehyde*

KNF dapat disebabkan oleh berbagai macam etiologi dan faktor risiko seperti infeksi virus, faktor risiko endogen yaitu genetika, serta faktor risiko eksogen seperti lingkungan. Salah satu faktor risiko lingkungan yang berpengaruh pada insidensi KNF adalah bahan karsinogen. Berbagai jenis bahan karsinogen

telah dipercaya dapat menimbulkan KNF dan salah satunya adalah *formaldehyde*.³

Formaldehyde adalah senyawa kimia yang tidak berwarna, mudah terbakar, dan berbau menyengat yang sering digunakan untuk bahan bangunan dan juga untuk memproduksi barang – barang buatan rumah tangga. *Formaldehyde* juga digunakan sebagai fungisida, germisida dan disinfektan. Selain itu *formaldehyde* digunakan sebagai bahan pengawet mayat dan juga untuk pengawet di laboratorium – laboratorium kedokteran.²⁵

Kadar *formaldehyde* yang melebihi 0,1 ppm dapat menyebabkan efek samping berupa mata berair, sensasi terbakar di mata, hidung, dan tenggorokan, serta dapat menimbulkan batuk – batuk, mengi (*wheezing*), mual, dan iritasi kulit.²⁵ Penelitian lain yang dilakukan di Kanada menyebutkan bahwa paparan kronik *formaldehyde* lebih dari 5 tahun dengan kadar *formaldehyde* lebih dari 30 ppm menimbulkan gangguan pernapasan seperti bronkitis kronis, nafas pendek, iritasi hidung, iritasi mata, dan kerusakan lapisan mukosa hidung. Paparan kronik pada binatang percobaan dengan kadar *formaldehyde* yang lebih tinggi yaitu lebih dari 710 ppm dapat menimbulkan perubahan pada saluran nafas atas seperti metaplasia skuamosa, hiperplasia epitel basalis serta rhinitis.²⁶ Conolly dkk pada tahun 2003 melakukan paparan kronik hirupan *formaldehyde* sebanyak 6,10, dan 15 ppm selama 6 jam per hari hingga menyebabkan karsinoma sel skuamosa kavum nasi pada tikus jenis F344.⁸

Pada tahun 1980, penelitian di Amerika Serikat menyebutkan bahwa paparan *formaldehyde* dapat menyebabkan kanker nasal pada tikus. Kemudian

pada tahun 1987, *U.S Environmental Protection Agency* (EPA) menggolongkan *formaldehyde* sebagai zat yang berpotensi karsinogen pada manusia. Beberapa penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa paparan *formaldehyde* berhubungan dengan beberapa jenis kanker. Pada tahun 2011, Badan Toksikologi Nasional Amerika Serikat menetapkan *formaldehyde* sebagai zat yang bersifat karsinogen bagi manusia.²⁵

Penelitian di Inggris menetapkan kadar toksik *formaldehyde* pada makanan atau minuman yang melebihi 2ppm atau pada uap terbuka sebanyak lebih dari 1 ppm atau juga pada tempat tertutup sebanyak lebih dari 0,6 ppm merupakan faktor risiko terjadinya KNF. Kemampuan *formaldehyde* dalam menyebabkan kanker diduga berhubungan dengan kemampuannya sebagai inisiator karsinogenesis dengan langsung menyebabkan mutasi DNA melalui jalur sistemik. Selain itu *formaldehyde* juga dapat menyebabkan toksisitas lokal dan mampu mengubah protein jaringan sehingga dapat menyebabkan terjadinya keganasan.³

Larutan *formaldehyde* dapat digolongkan sebagai *pro-carcinogen* yang berarti tidak langsung menimbulkan kanker, melainkan harus melalui proses metabolisme terlebih dahulu oleh enzim – enzim tubuh sehingga menjadi *ultimate carcinogen* (bersifat sangat reaktif dalam ikatan dengan DNA), kemudian *formaldehyde* juga menimbulkan reaksi toksik, epoksidasi, dan hidroksilasi yang pada akhirnya menyebabkan mutasi DNA. *Formaldehyde* juga berperan sebagai *co-carcinogen* yang dapat memperbesar reaktivitas kelompok karsinogen yaitu

direct acting carcinogen atau *pro-carcinogen* lain.³ Di samping itu *formaldehyde* juga berperan dalam pembentukan radikal bebas oksigen dan nitrogen.²⁷

Di dalam hepar *formaldehyde* sebagai senyawa *xenobiotic* akan mengalami reaksi metabolisme atau detoksikasi yang terjadi melalui dua fase. Proses ini bertujuan untuk meningkatkan kelarutan *formaldehyde* di dalam air sehingga akan mudah diekskresi melalui ginjal.

- 1) Reaksi metabolisme *xenobiotic* fase 1 (fase hidroksilasi). Melalui fase ini senyawa *xenobiotic* diubah menjadi derivat *xenobiotic* terhidroksilasi yang lebih mudah larut. Proses ini dikatalisir oleh kelompok enzim monooksigen atau sitokrom P450.
- 2) Reaksi metabolisme *xenobiotic* fase 2 (fase konjugasi). Dalam fase ini, derivat *xenobiotic* yang telah terhidroksilasi akan terkonjugasi dengan molekul asam glukuronat dan glutathione sehingga menjadi bentuk yang lebih mudah larut dalam air.

Apabila kedua reaksi ini gagal maka senyawa *xenobiotic* akan bereaksi dengan sel tubuh melalui ikatan kovalen makromolekul sel (DNA, RNA, protein). Ikatan kovalen ini kemudian akan mengawali fase inisiasi karsinogenesis dimana hal tersebut dimulai dengan terjadinya mutasi DNA dan dilanjutkan dengan aktivasi proliferasi sel (Gambar 1).³

Sumber lain menyatakan bahwa dalam proses pembuatannya *formaldehyde* mengandung radikal bebas yang berupa merkuri. Merkuri dalam *formaldehyde* inilah yang juga berpotensi menimbulkan KNF.²⁸

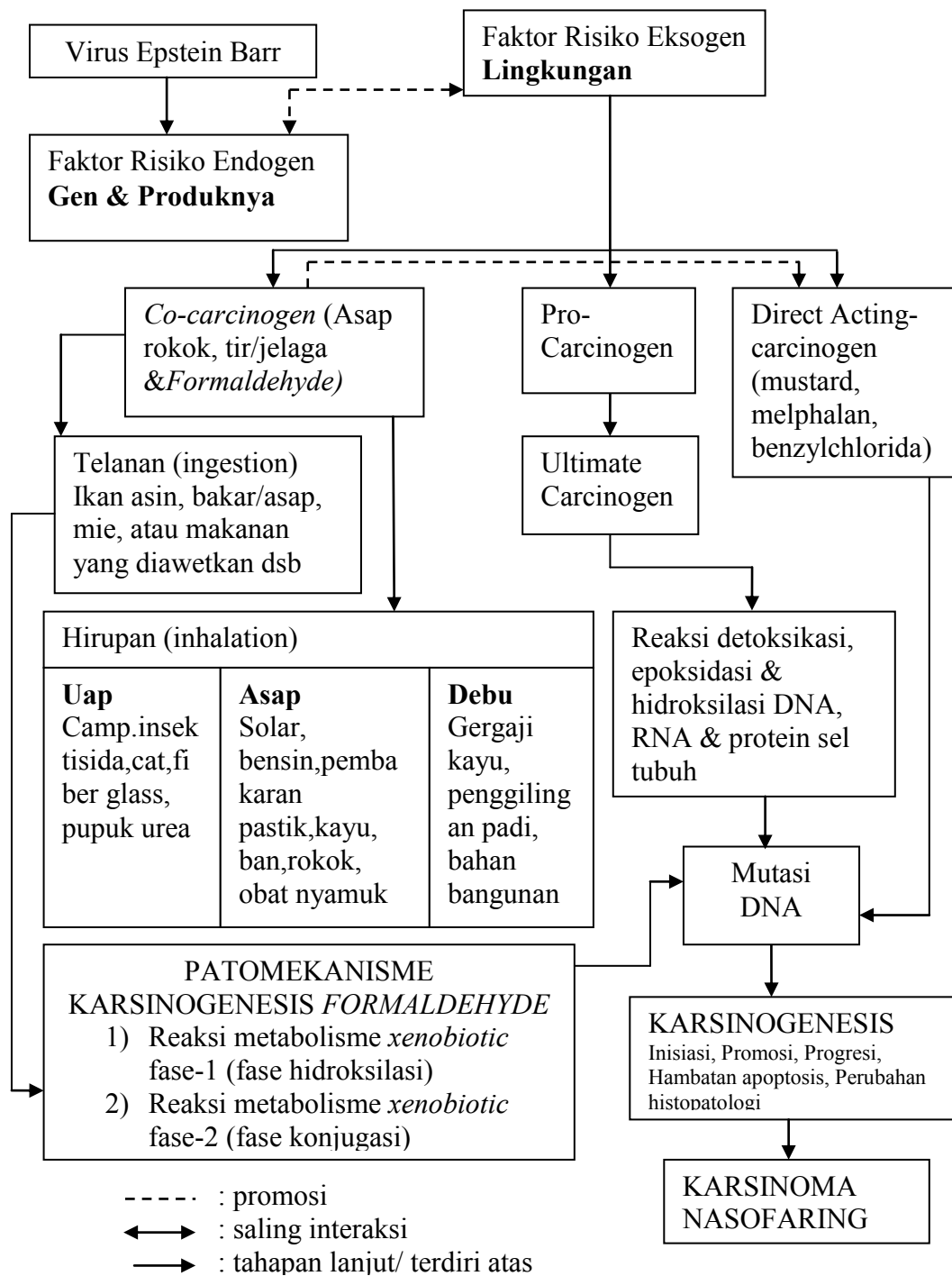
2.3 Perubahan Histopatologi Epitel Mukosa Nasofaring

Rangsangan kronik mukosa nasofaring oleh formalin menyebabkan perubahan sel ke arah irreversibel. Struktur mukosa nasofaring yang merupakan peralihan antara epitel skuamous dan kolumner. Epitel ini dapat mengalami hiperplasia, yaitu pembesaran mukosa akibat bertambahnya jumlah sel. Selain hiperplasia dapat juga terjadi metaplasia yaitu perubahan bentuk dari satu jenis sel ke jenis yang lain yang serupa diferensiasinya dan masih bersifat reversibel. Tahapan selanjutnya dari perubahan adaptif sel mukosa nasofaring akibat paparan formalin adalah displasia.³

Displasia merupakan kelainan proliferasi non neoplastik dari sel epitel, dimana sel epitel akan kehilangan uniformitas dan orientasi arsitekturnya. Sel-sel displastik menunjukkan pleomorfisme (variasi bentuk dan ukuran) dan nukleus yang seringkali tercat lebih gelap (hiperkromatik), dengan ukuran abnormal lebih besar. Selain itu, sel displastik juga terdapat gambaran mitosis yang lebih banyak daripada biasanya.³

Perubahan displastik merupakan kondisi premaligna dengan tiga derajat diferensiasi, yaitu; ringan, sedang dan berat. Penentuan derajat diferensiasi epitel yang mengalami displasia, didasarkan dengan penilaian terhadap; 1) adanya pertumbuhan jaringan berupa tonjolan atau permukaan yang berbenjol-benjol akibat dari penebalan lapisan epitel, disertai dengan bertambahnya mitosis, 2) ditemukannya sel atipik yang pleiomorfik, rasio inti-sitoplasma meningkat dan bertambahnya DNA inti, dan kelainan diferensiasinya. Displasia ringan sampai sedang menampakkan perubahan tidak di seluruh ketebalan epitel dan bisa

bersifat reversibel. Sedangkan, displasia berat ditandai dengan perubahan nyata pada seluruh ketebalan epitel, sehingga disebut karsinoma *in situ*.³



Gambar 1. Skema patomekanisme karsinogenesis nasofaring³

2.4 Kompleksitas Sistem Sel dan Nanobiologi

Sistem dalam hidup merupakan sistem yang terbuka dan dinamis yang secara berkelanjutan membantu sel untuk mencapai kondisi optimum. Hal ini terjadi akibat interaksi di dalam dan atau dengan lingkungan dalam berbagai sistem yang independen untuk mencapai homeostasis.²⁹

Tubuh manusia terdiri dari empat juta triliun atom yang mengikuti sifat aliran listrik antara lain : muatan listrik, voltase, tegangan listrik, aliran listrik, medan listrik, dan tahanan. Sifat tersebut membuat jaringan dapat menerima, mendorong, mengirim getaran atau gelombang, seperti elektrik, akustik, magnetik, mekanik, dan termal.²⁹

Sel mempunyai kemampuan mengatur elektrisitas dan membentuk elektromagnetik yang berfungsi sebagai generator. Pada tubuh elektrisitas dilaksanakan oleh pembawa muatan yang aktif bergerak yaitu elektron dan anion sebagai pembawa muatan negatif serta ion hidrogen, Na, K, dan Ca sebagai pembawa muatan positif. Dalam sistem biologis setiap nano partikel baik berupa enzim, DNA, dan komponen-komponen penyelenggara hidup lainnya bekerja menyelenggarakan sistem aliran energi dan materi membangun keteraturan normal, mereka melaksanakan mekanisme transfer energi dalam skala milliVolt dengan tingkat efisiensi yang sangat tinggi.²⁹

Konsep sehat dan sakit pun berhubungan dengan aliran bio elektrik tubuh. Pemanfaatan nanobiologi dalam pengobatan berbagai macam penyakit termasuk kanker adalah dengan memberi energi dan elektron pada sel sakit agar dapat memperbaiki dan mengoptimalkan diri menjadi sel sehat.^{11,14,29}

Nanobiologi sendiri merupakan gabungan dari berbagai macam bidang ilmu seperti kimia, fisika, teknik, dan biologi molekuler.⁹ Ia merupakan disiplin ilmu baru yang dapat merevolusi dunia kesehatan. Metode ini memiliki potensi yang cukup besar untuk pengobatan kanker yang dapat digunakan oleh para dokter. Cara nanobiologi bekerja adalah dengan membangun perangkat molekul dan berupaya untuk membangun mesin molekuler yang memanfaatkan konsep alam.¹⁰

Molekul – molekul dalam nanobiologi berukuran 1 – 100 nm sebagai contohnya ribosom, enzim, DNA, dan lain – lain.¹¹ Ukuran nanobiologi yang sangat kecil tersebut sangat cocok dengan ukuran molekul – molekul biologi dan struktur dalam sel.⁸ Unit – unit dalam nanobiologi ini pada umumnya berupa makromolekul. Mereka merupakan susunan kompleks yang tersusun dari beberapa komponen monomer. Mereka bekerja sangat spesifik bahkan dianggap memiliki kecerdasan karena tahu kapan, bagaimana, dimana dan dengan siapa mereka harus bekerja.¹¹

Metode pengobatan kanker yang telah ada sekarang memiliki kekurangan. Teknik – teknik pencitraan seperti MRI, CT-Scan, dan ultrasonografi memiliki resolusi yang terbatas dalam pencitraannya dan tidak dapat mendeteksi perubahan di tingkat molekuler. Disamping itu interpretasi yang ditemukan dapat dipersulit dengan adanya struktur anatomi yang rumit, edema atau inflamasi. Pergerakan pasien selama pencitraan dan adanya implant gigi juga dapat mengurangi detail hasil interpretasi. Di daerah kepala dan leher reseksi bedah dibatasi oleh beberapa struktur penting yang berdekatan seperti mata, arteri karotis dan otak. Sisa kanker

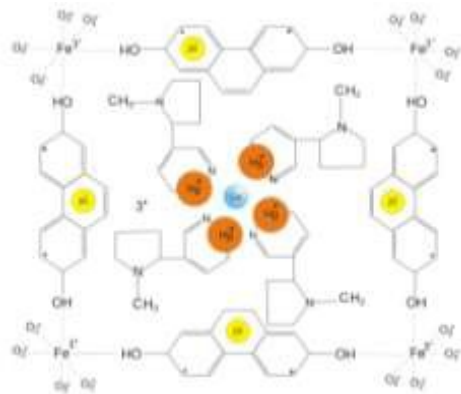
juga dapat tertinggal di dekat struktur vital atau bahkan menyebar ke luar margin bedah. Terapi radiasi memiliki tingkat kegagalan yang tinggi untuk tumor stadium lanjut, selain itu karena toksisitas yang dimilikinya, jumlah dosis yang diberikan pada terapi radiasi harus dibatasi. Sedangkan kemoterapi pada kanker kepala dan leher memiliki peran terbatas pada kombinasi dengan radioterapi. Bila dibandingkan dengan metode – metode konvensional tersebut, nanobiologi memiliki kelebihan antara lain memiliki toksisitas yang rendah, selektif untuk terapi tumor, serta merupakan jenis pencitraan yang sensitif dan spesifik baik untuk struktur anatomi, molekuler, maupun biologi.⁹

2.5 Pengobatan KNF dengan Metode Pengasapan *Divine* Kretek

Kretek merupakan rokok cengkeh yang berasal dari Indonesia. Tembakau dalam rokok kretek yang telah ada sekarang merupakan bahan yang berbahaya bagi kesehatan manusia karena memiliki kandungan toksik. Penelitian sebelumnya telah berhasil mengubah rokok kretek biasa yang memiliki kandungan toksik menjadi rokok kretek sehat yang disebut *divine* kretek.¹¹

Asap rokok biasa mengandung sejumlah besar komponen toksik seperti Hg, NH₃, CO, CO₂, NO, NO₂, HCN, nikotin dan juga logam – logam seperti nikel, cadmium, tembaga, besi, arsenic serta partikel – partikel hidrokarbon seperti benzopyrene, benzanthrane, dan chrysene. Dalam *divine* kretek partikel – partikel toksik tersebut diubah menjadi partikel berukuran kecil (ukuran nano) yang memiliki energi yang potensial untuk menciptakan struktur yang kompleks dimana struktur tersebut lebih ramah bagi lingkungan dan juga bagi manusia.

Molekul – molekul dalam nanobiologi ini dianggap cerdas karena tahu kapan, bagaimana, dimana dan dengan siapa mereka harus bekerja.^{11&13} Berikut ini adalah ilustrasi nanostruktur *divine* kretek (Gambar 2) :



Gambar 2. Nanostruktur *divine* kretek¹³

Blok molekul yang besar (nanostruktur) memiliki struktur yang stabil dan dapat memicu proses penangkapan ion Hg pada nikotin. Sifat nanostruktur ini membuat *divine* kretek dapat mengeliminasi toksisitas Hg (Gambar 2).¹³

Dalam pembuatan *divine* kretek, ditambahkan suatu bahan kimia sebagai *scavenger* (pembawa radikal bebas dalam tubuh) yang merupakan senyawa aromatik yang mampu berkembang menjadi struktur yang kompleks bersama dengan komponen rokok lainnya ketika rokok tersebut dibakar. Struktur kompleks ini kaya akan elektron berdensitas tinggi sehingga memiliki energi potensial yang juga cukup tinggi untuk mentransfer elektron.³⁰ Karena kandungan energi potensial dan *scavengernya* ini maka *divine* kretek diharapkan dapat memberi energi dan elektron pada sel-sel nasofaring yang sakit kemudian mendorong dan mengoptimalkan diri sel sehat serta dapat menetralkan, mengikat, dan membuang

radikal bebas dari dalam tubuh.¹⁴ Penelitian lain menyebutkan bahwa radikal bebas dalam rokok seperti NO, NO₂, HCN, CO, dan CO₂ dieliminasi dengan menangkap mereka dengan menggunakan *scavenger*. Hasil dari eliminasi ini ditandai dengan asap rokok yang tidak berbau dan adanya perubahan ukuran partikel menjadi lebih kecil.¹⁵

2.6 Indeks Apoptosis

Apoptosis adalah suatu kematian sel yang terprogram. Saat terjadi apoptosis, enzim, protein, dan DNA akan terurai. Sel yang mengalami apoptosis akan mengeluarkan sinyal berupa fosfolipid ke ruang ekstraseluler. Sinyal ini kemudian dikenali oleh sel – sel imun terutama makrofag.¹⁶ Makrofag kemudian akan memfagositosis sel yang mengalami apoptosis tersebut.³¹ Secara mikroskopik sel yang mengalami apoptosis akan terlihat sebagai sel tunggal bulat dengan gambaran kromatin yang terkondensasi berwarna basofilik. Sel inilah yang disebut sebagai *apoptotic body* (gambar 3). Kadang gambaran kromatinnya juga terlihat terpecah – pecah dengan sitoplasma yang eosinofilik.¹⁶

Terdapat berbagai macam stimulasi yang dapat menginduksi apoptosis. Stimulasi tersebut adalah agen kemoterapi, ultraviolet, panas, ketidakseimbangan osmosis, dan *nitric oxide*. Yang akan dijelaskan di sini adalah apoptosis yang diinduksi oleh CTL dan sel NK yang diinduksi oleh *nonsecretory induced*, *ligand induced*, dan *secretory induced* dengan granzyme melalui perantaraan sekresi perforin.³³

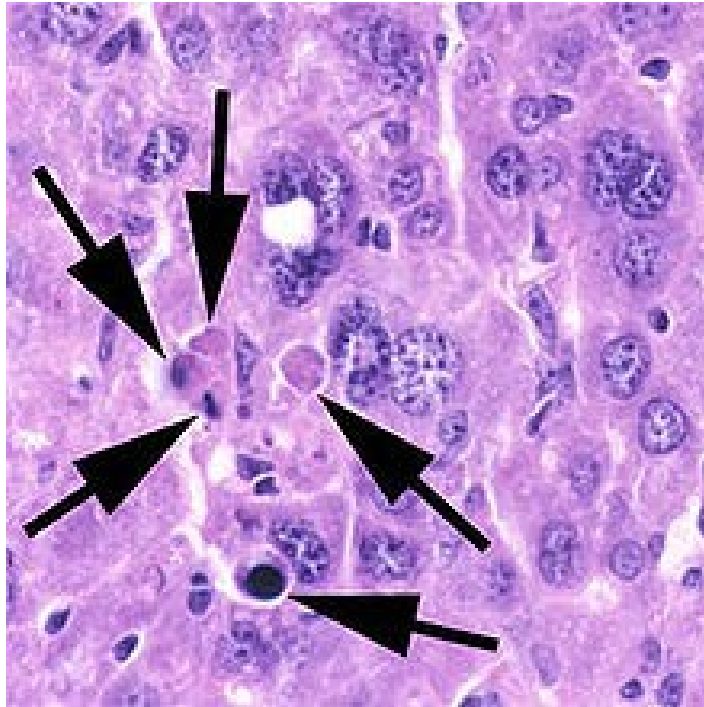
Kerusakan DNA dalam apoptosis dipicu oleh enzim caspase. Target dari caspase ini adalah protein *DNA repair system*, protein struktural atau sitoskeleton (aktin, cytokeratin, lamin, dan lain – lain), serta onkoprotein. Caspase juga mengaktifkan DNase yang menyebabkan kerusakan DNA selama apoptosis.³³

Caspase diaktifkan oleh granzyme atau katalisator protease seperti FLICE (*FADD Like IL 1 Converting Enzyme*) yang berikatan dengan FADD (*Fat Associated Death Domain*) pada reseptor CD95/Fas setelah terjadi kontak dengan Fas ligand. Fas ligand ini berasal dari ekspresi protein antigen dari CTL, sitokin TNF, maupun metabolit ligand pada Fas reseptor.³¹

Aktivasi *secretory induced* caspase dilakukan oleh CTL dan sel NK melalui granula sitotoksiknya yang berisi *pore forming* perforin (cytolysin) dan granzyme yang merupakan enzim famili serine protease. Granzyme terdiri dari granzyme B, granzyme A, granzyme C,D,E,F,G,H,K, M.³³ Melalui proses – proses tersebut terjadi apoptosis dalam sel tubuh.

Dalam keadaan transformasi keganasan, sel yang mengalami transformasi tersebut tidak lagi mampu disingkirkan melalui apoptosis sehingga terjadi resistensi apoptosis.³⁴ Penelitian A Agung Purnama yang mencoba mengujicobakan suatu zat anti kanker yaitu *Echinacea Purpurea* dengan menilai indeks apoptosisnya terbukti dapat meningkatkan indeks apoptosis pada mencit dengan kanker payudara.¹⁶ Hasil penelitian ini juga diharapkan dapat meningkatkan indeks apoptosis pada karsinogenesis nasofaring mencit C3H yang dipapar *divinekretek*. Perhitungan indeks apoptosis dilakukan dengan metode yang digunakan oleh Aihara M et al. dengan pengecatan yang akan dilakukan

adalah pengecatan HE dimana nantinya sel apoptosis akan terlihat sebagai sel tunggal bulat dengan gambaran kromatin yang terkondensasi berwarna basofilik.¹⁶

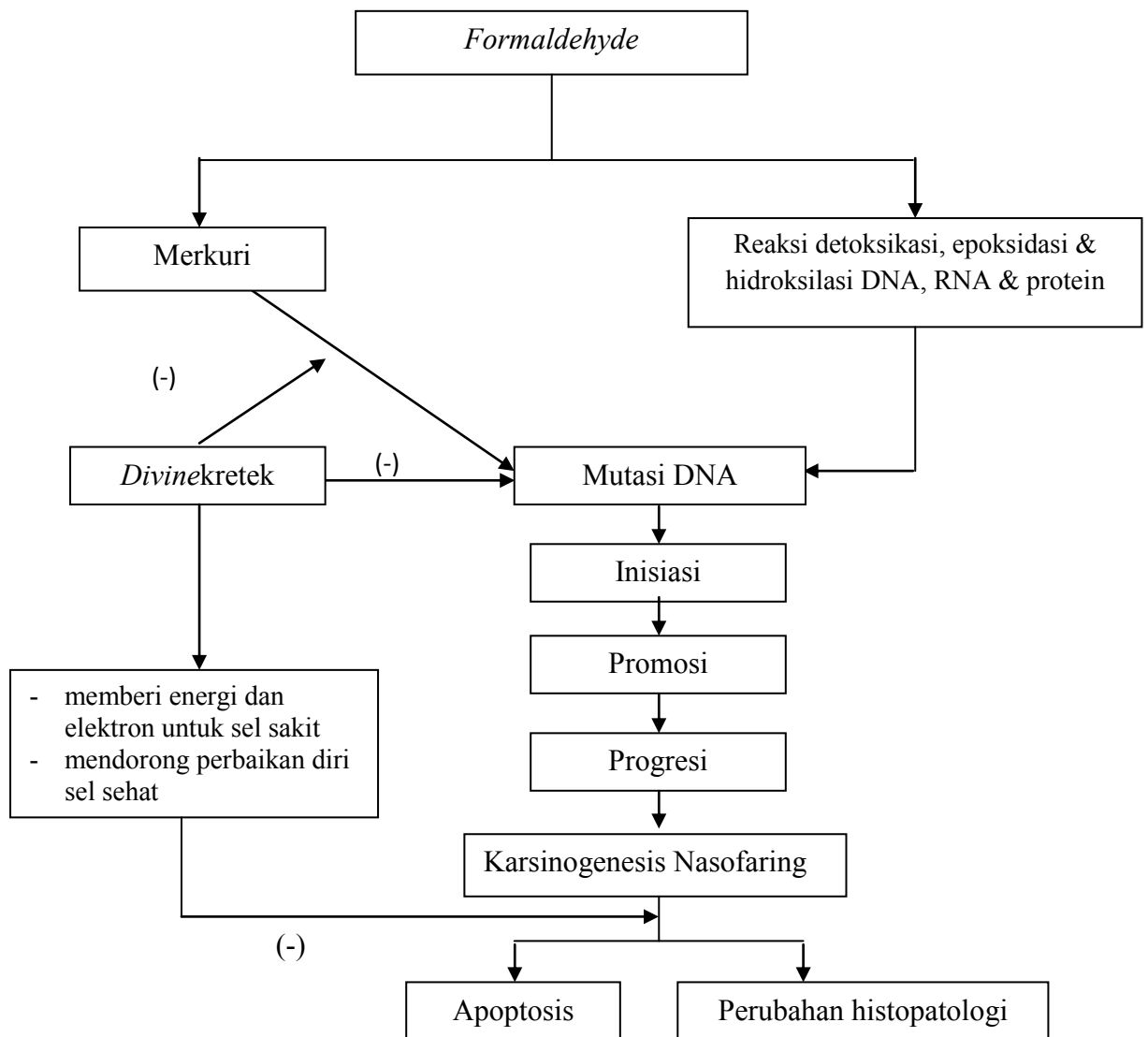


Gambar 3. Apoptotic body³²

BAB 3

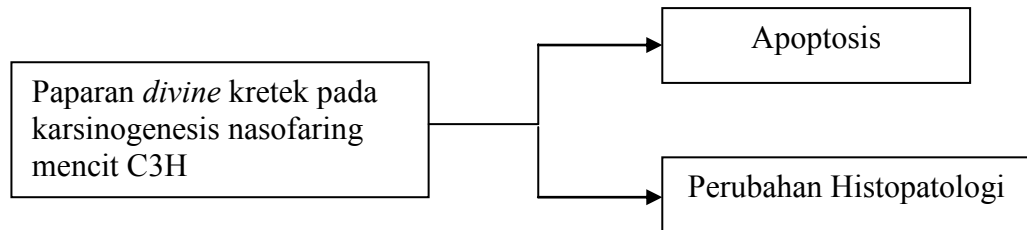
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori



Gambar 4. Kerangka teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 5. Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

- 1) Hipotesis dari penelitian ini adalah indeks apoptosis lebih tinggi dan perubahan histopatologi epitel mukosa nasofaring mencit C3H lebih baik pada karsinogenesis nasofaring mencit C3H yang dipapar *divine* kretek dibandingkan dengan yang dipapar rokok kretek biasa.
- 2) Terdapat perbedaan indeks apoptosis dan perubahan histopatologi epitel mukosa nasofaring mencit C3H pada pemberian *divine* kretek antara selama dan sesudah diinduksi *formaldehyde*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini meliputi bidang ilmu kesehatan THT – KL dan Patologi Anatomi.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro selama 5 bulan (Februari – Juni 2012).

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan *post test only control group design*. Hewan coba dalam penelitian ini adalah mencit strain C3H.

4.4 Sampel Penelitian

4.4.1 Sampel

Sampel penelitian adalah mencit strain C3H yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

4.4.1.1 Kriteria inklusi

Kriteria inklusi dari penelitian ini adalah :

- 1) Mencit jantan
- 2) Strain C3H
- 3) Umur \pm 3 bulan
- 4) Berat Badan \pm 20 gram
- 5) Tidak tampak abnormalitas anatomi

4.4.1.2 Kriteria eksklusi

Kriteria Eksklusi dari penelitian ini adalah :

- 1) Mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif)
- 2) Mencit mati selama perlakuan berlangsung (drop out)

4.4.2 Besar Sampel

Penentuan besar sampel dilakukan menurut aturan WHO yaitu minimal lima ekor tiap kelompok.

Mencit C3H dalam penelitian ini dibagi dalam empat kelompok yaitu kelompok kontrol positif 1 (K1), kelompok kontrol positif 2 (K2), kelompok perlakuan 1 (P1), dan kelompok perlakuan 2 (P2).

Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan dan minum secara *ad libitum*.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah paparan *divine* kretek dan paparan rokok kretek biasa.

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah indeks apoptosis dan perubahan histopatologi epitel mukosa nasofaring.

4.6 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini adalah :

- 1) Paparan *divine* kretek yang dimaksud adalah pemberian asap hasil pembakaran rokok kretek yang telah diberi cairan RDE yang mengandung asam amino metionin dan fenilalanin dalam bentuk partikel nano. Satu batang *divine* kretek dibakar untuk satu kelompok mencit kemudian dilanjutkan dengan penyemprotan asap sebanyak 2 x 20 cc pada anus mencit. Penyemprotan dilakukan dengan cara memasang rokok pada pipa yang terhubung dengan spuit 60 cc, kemudian rokok dibakar dan setelah

itu asap rokok dihisap dengan spuit tersebut hingga mencapai 20 cc. Tujuan penyemprotan asap pada anus mencit ini adalah untuk menambah dosis dan juga untuk mencegah efek formalin dalam saluran pencernaan.(Sarjadi 2012, komunikasi personal, 10 Januari)

Skala : Nominal

- 2) Paparan rokok kretek biasa yang dimaksud adalah pemberian asap hasil pembakaran rokok kretek yang tidak diberi cairan RDE. Satu batang rokok kretek dibakar untuk satu kelompok mencit kemudian dilanjutkan dengan penyemprotan asap sebanyak 2 x 20 cc pada anus mencit. Penyemprotan dilakukan dengan cara memasang rokok pada pipa yang terhubung dengan spuit 60 cc, kemudian rokok dibakar dan setelah itu asap rokok dihisap dengan spuit tersebut hingga mencapai 20 cc. (Sarjadi 2012, personal communication, January 10)

Skala : Nominal

- 3) Perhitungan indeks apoptosis dilakukan dengan metode Aihara M *et. al* yaitu dengan menghitung badan apoptotik per 100 sel tumor dari area yang signifikan dengan pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang dari tiap preparat, dalam satu blok parafin kemudian diambil nilai rata-ratanya.³¹

Index apoptosis (IA) = (sel apoptosis/total sel) x 100%

Skala : Rasio

- 5) Perubahan histopatologi mukosa epitel nasofaring dengan skala ordinal dinilai dengan skor sebagai berikut (Tabel 6)³

Tabel 6. Skor Perubahan Histopatologi

Skor	Perubahan histopatologi mukosa epitel nasofaring
1	
2	Hiperplasia: jumlah sel normal bertambah
3	Metaplasia: perubahan sel dari satu bentuk ke bentuk lainnya yang masih bersifat reversible
4	Displasia ringan: tampak proliferasi atau hiperplasia sel dari lamina basalis dan parabasal, tidak meluas melebihi sepertiga epitelial. Secara sitologik tampak atipik, namun umumnya ringan dengan hanya ada sedikit sel atau inti yang pleomorfik. Mitosis tak tampak menonjol, dan biasanya terjadi di basal dan normal, dengan perubahan struktur sel yang minimal.
5	Displasia sedang: tampak proliferasi sel atipik yang meluas ke sepertiga tengah epitelial. Perubahan sitologik lebih hebat dibanding displasia ringan, misal tampak hiperkromatik, inti dan sel yang pleomorfik. Mitosis meningkat dan abnormal, namun biasanya terletak di lamina basalis. Perubahan struktur sel tampak di pertengahan bawah epitel, karena hilangnya polaritas sel. Namun, stratifikasi dan maturasi sel relatif normal, sering disertai hiperkeratosis.
6	Displasia berat : tampak proliferasi abnormal di lapisan basalis sepertiga atas epitel. Perubahan sitologik dan struktur sel sangat menonjol. Semua perubahan yang tampak pada displasia sedangkan multipel yang mencolok. Mitosis suprabasal terjadi mencolok, biasanya berbentuk bintang (tripolar) abnormal. Badan apoptotik terlihat nyata. Perubahan struktur sel hebat dan seringkali dengan keratinisasi abnormal. Kadang tampak akantolisis dengan disrupsi epitelial.

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan – bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah:

- 1) Rokok kretek biasa
- 2) Larutan RDE
- 3) Mencit C3H sesuai kriteria

- 4) Formalin 40%
- 5) Aquades untuk mengencerkan formalin
- 6) Larutan formalin 20% yang dialirkan dalam ruang semi tertutup berukuran 50x30x20 cm³
- 7) Pakan standar mencit
- 8) Pakan yang telah dicampur formalin 10% dengan dosis 54 mg/kgBB
- 9) Bahan untuk preparat histopatologi dengan pengecatan HE

4.7.2 Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- 1) Kandang mencit yang digunakan untuk induksi *formaldehyde* dan perlengkapannya
- 2) Kandang mencit yang digunakan untuk paparan asap *divine* kretek dan rokok kretek biasa serta perlengkapannya
- 3) Sduit 60 cc untuk menyemprotkan asap
- 4) Pemantik api
- 5) Seperangkat alat bedah minor

4.7.3 Jenis Data

Jenis data dalam penelitian ini adalah data primer yang didapat dari hasil perhitungan skor perubahan histopatologi epitel mukosa nasofaring mencit C3H dan perhitungan indeks apoptosis menurut metode Aihara M *et.al*. Penilaian indeks apoptosis dilakukan dengan pengecatan HE di bawah mikroskop dengan pembesaran 400X.

4.7.4 Cara Kerja

Cara kerja penelitian ini ialah sebagai berikut :

Sebelum diberi perlakuan, keseluruhan mencit mendapat induksi *formaldehyde*. Induksi karsinogenesis nasofaring dengan formalin dilakukan dengan metode Conolly yang dimodifikasi yaitu menggunakan uap dari larutan formalin 20% yang dialirkan ke dalam ruang semi tertutup berukuran 50x30x20cm³ selain itu juga ditambah dengan diet standar oral yang mengandung 54 mg/kgBB formalin 10% per hari selama 9 minggu.³

Mencit jantan strain C3H diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara tiap kelompok perlakuan dan diberi pakan standar selama satu minggu secara *ad libitum*. Tiap kelompok perlakuan terdiri dari delapan ekor mencit yang ditentukan secara acak dengan lima ekor mencit sebagai hewan coba utama dan tiga ekor mencit sebagai cadangan. Kemudian tiap – tiap kelompok perlakuan tersebut mendapat perlakuan sebagai berikut :

- 1) Kelompok K1 : Kelompok kontrol positif 1 yaitu kelompok yang diberi paparan asap kretek biasa, serta diinduksi uap formalin 20% dan diberi diet standar mengandung 54 mg/kgBB formalin 10% tiap hari selama 18 minggu.
- 2) Kelompok K2 : Kelompok kontrol positif 2 yaitu kelompok yang diinduksi uap formalin 20% serta diberi diet standar mengandung 54 mg/kgBB formalin 10% selama 9 minggu, kemudian selama 9 minggu berikutnya diberi paparan asap kretek biasa.

- 3) Kelompok P1 : Kelompok perlakuan 1 yaitu kelompok yang diberi paparan *divine* kretek serta diinduksi uap formalin 20% dan diberi diet standar mengandung 54 mg/kgBB formalin 10% tiap hari selama 18 minggu.
- 4) Kelompok P2 : Kelompok perlakuan 2 yaitu kelompok yang diinduksi uap formalin 20% dan diberi diet standar mengandung 54 mg/kgBB formalin 10% selama 9 minggu, kemudian selama 9 minggu berikutnya diberi paparan asap *divine* kretek.

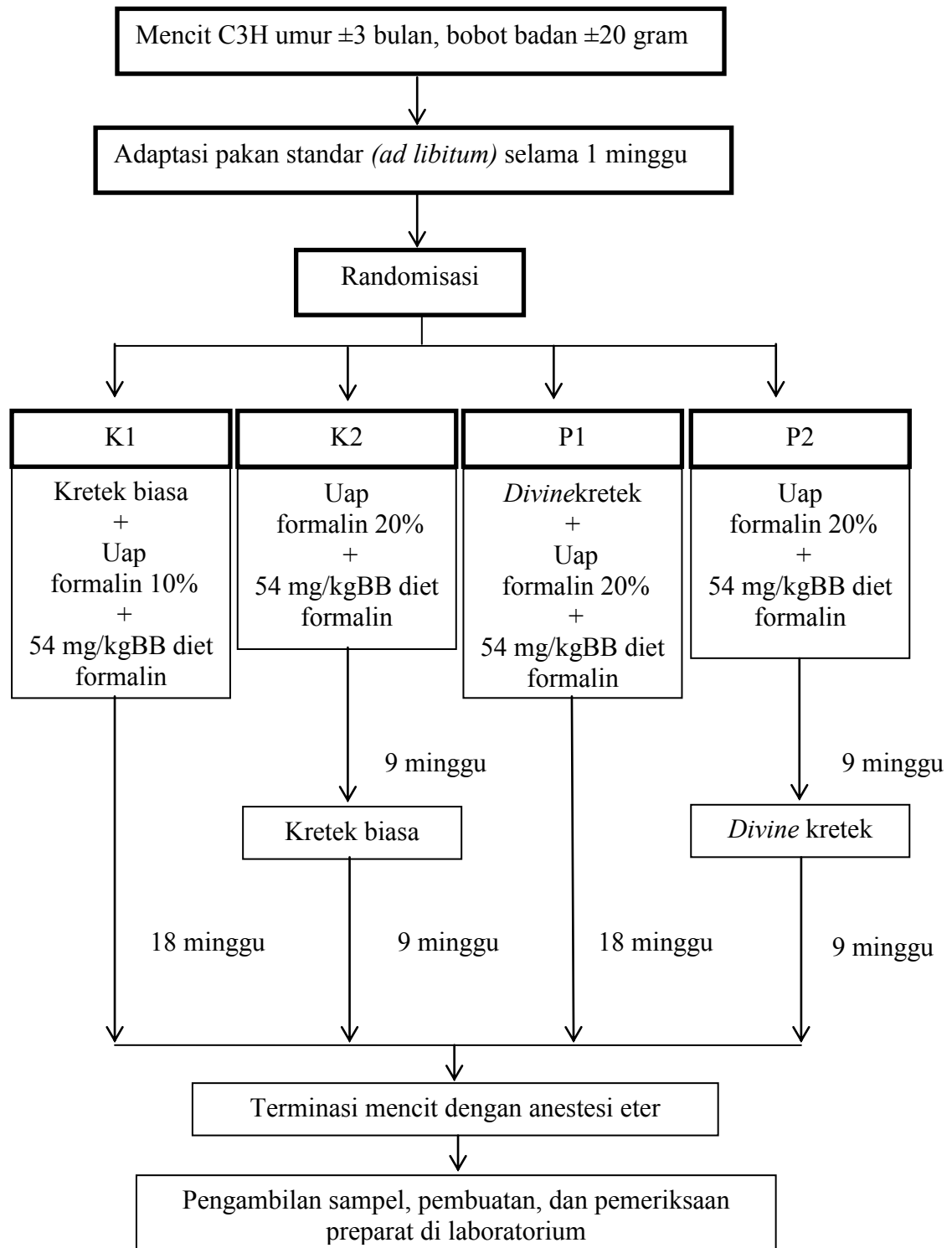
Kemudian satu ekor mencit dari tiap kelompok akan diterminasi pada minggu ke – 9 untuk dilihat perubahan sel mukosa nasofaring setelah sebelumnya dilakukan anastesi dengan eter sesuai kelompoknya. Setelah itu diambil sediaan nasofaring dan dikirim ke Laboratorium Patologi Anatomi untuk dilakukan pemeriksaan indeks apoptosis dengan terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan histopatologi epitel mukosa nasofaring. Pemeriksaan histopatologi epitel nasofaring dilakukan pada setiap blok parafin. Pada setiap sediaan dilakukan perhitungan pada daerah yang paling anaplastik dengan menghindari daerah nekrotik dan sel yang bertumpuk. Perhitungan indeks apoptosis dilakukan menurut metode Aihara M *et.al* yaitu dengan menghitung badan apoptotik per 100 sel tumor dari area yang signifikan dengan pembesaran 400x pada 10 lapangan pandang dari tiap preparat, dalam satu blok parafin kemudian diambil nilai rata-ratanya.

Index apoptosis (IA) = (sel apoptosis/total sel) x 100%

Teknik pemeriksaan dilakukan dengan cara :

- 1) Tikus dianestesi dengan eter
- 2) Pengambilan nasofaring tikus dengan cara memotong bagian kepala kemudian membuang mandibula
- 3) Pemrosesan jaringan
- 4) Pengecatan HE untuk melihat indeks apoptosis dan perubahan histopatologi epitel nasofaring

4.8 Alur Penelitian



6. Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

Data dikelompokkan berdasarkan variabelnya dalam skala nominal, rasio, dan ordinal. Untuk perhitungan indeks apoptosis dilakukan uji normalitas menggunakan Shapiro Wilk. Uji hipotesis dilakukan dengan menggunakan uji one way anova sebagai uji parametrik jika memenuhi syarat. Jika syarat uji parametrik tidak terpenuhi maka digunakan uji Kruskal-Wallis sebagai uji non parametriknya dilanjutkan dengan uji posthoc Mann Whitney sedangkan untuk penilaian skor perubahan histopatologi, data cukup dianalisis dengan menggunakan uji Kruskal Wallis. Data yang didapat diolah dengan menggunakan komputer.

4.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance penelitian ini diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RS Dr. Kariadi Semarang. Hewan coba dalam penelitian ini akan diberi pakan dan minum secara *ad libitum*, dipelihara dengan baik, dijaga kebersihan kandangnya, serta diperlakukan secara baik selama transportasi dan dijaga penanganannya sesuai tingkah laku dan kebutuhan biologis hewan coba.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan 32 ekor mencit C3H yang dibagi menjadi empat kelompok yaitu kelompok yang mendapat paparan asap rokok kretek biasa selama induksi *formaldehyde* (K1), kelompok yang mendapat paparan asap rokok kretek biasa setelah induksi *formaldehyde* (K2), kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* (P1), serta kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek setelah induksi *formaldehyde* (P2). Dua ekor mencit mati selama proses adaptasi sebelum perlakuan dimulai, serta terdapat dua ekor mencit yang berjenis kelamin betina sehingga dieksklusikan. Pada 9 minggu pertama penelitian, satu ekor mencit dari tiap kelompok diterminasi, untuk dinilai proses karsinogenesis nasofaringnya. Kemudian empat mencit lainnya dieksklusi karena mati. Di akhir penelitian, mencit yang tersisa sebanyak 20 ekor, dimana jumlah sampel minimal sebanyak 5 ekor per kelompok masih terpenuhi. Selanjutnya seluruh mencit yang tersisa diterminasi untuk diambil nasofaringnya.

Sediaan nasofaring kemudian diwarnai dengan pengecatan HE. Kemudian dilakukan pemeriksaan skor histopatologi pada tiap preparat secara membata. Hasil pemeriksaan skor histopatologi epitel nasofaring mencit C3H dapat dilihat dalam tabel 8 dan 9.

Tabel 8. Skor Histopatologi Epitel Mukosa Nasofaring

Kelompok	Skor Histopatologi Epitel Mukosa Nasofaring				
	Nomor Mencit				
	1	2	3	4	5
Diberi paparan kretek biasa selama induksi <i>formaldehyde</i> (K1)	4	4	4	4	4
Diberi paparan kretek biasa sesudah induksi <i>formaldehyde</i> (K2)	4	4	1	1	1
Diberi paparan <i>divine</i> kretek selama induksi <i>formaldehyde</i> (P1)	1	1	1	4	1
Diberi paparan <i>divine</i> kretek sesudah induksi <i>formaldehyde</i> (P2)	4	1	1	1	1

Tabel di atas menunjukkan bahwa skor histopatologi kelompok yang mendapat paparan asap rokok kretek biasa selama induksi *formaldehyde* (K1) adalah displasia ringan (skor 4) sebanyak 5 ekor mencit; skor histopatologi kelompok yang mendapat paparan asap rokok kretek biasa setelah induksi *formaldehyde* (K2) adalah normal (skor 1) sebanyak 3 ekor mencit dan displasia ringan (skor 4) sebanyak 2 ekor mencit; skor histopatologi kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* (P1) adalah normal (skor 1) sebanyak 4 ekor mencit dan displasia ringan (skor 4) sebanyak 1 ekor mencit; skor histopatologi kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek setelah induksi *formaldehyde* (P2) adalah normal (skor 1) sebanyak 4 ekor mencit dan displasia ringan (skor 4) sebanyak 1 ekor mencit.

Tabel 9. Nilai Mean dan Median Skor Histopatologi

Kelompok	Skor Histopatologi Epitel Mukosa Nasofaring	
	Mean \pm SD	Median
Diberi paparan kretek biasa selama induksi <i>formaldehyde</i> (K1)	4,00 \pm 0,00	4
Diberi paparan kretek biasa sesudah induksi <i>formaldehyde</i> (K2)	2,2 \pm 1,64	1
Diberi paparan <i>divine</i> kretek selama induksi <i>formaldehyde</i> (P1)	1,6 \pm 1,34	1
Diberi paparan <i>divine</i> kretek sesudah induksi <i>formaldehyde</i> (P2)	1,6 \pm 1,34	1

Dalam penelitian ini perubahan skor histopatologi hanya mencapai tahap displasia ringan sehingga belum dapat dilihat badan apoptosisnya. Tabel 8 dan tabel 9 memperlihatkan hasil skor histopatologi epitel nasofaring; kelompok yang mendapat paparan asap rokok kretek biasa selama induksi *formaldehyde* (K1) dengan mean dan standar deviasi 4,00 \pm 0,00, kelompok yang mendapat paparan asap rokok kretek biasa setelah induksi *formaldehyde* (K2) dengan mean dan standar deviasi 2,2 \pm 1,64, kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* (P1) dengan mean dan standar deviasi 1,6 \pm 1,34, dan kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek setelah induksi *formaldehyde* (P2) dengan mean dan standar deviasi 1,6 \pm 1,34. Berdasarkan median dari tabel di atas juga dapat dilihat bahwa hanya kelompok yang mendapat paparan asap rokok kretek biasa selama induksi *formaldehyde* (K1) yang mencapai skor histopatologi displasia ringan (skor 4) sedangkan nilai median skor histopatologi untuk ketiga kelompok lainnya adalah normal (skor 1).

Tabel 10. Uji Kruskal Wallis Skor Histopatologi Epitel Mukosa Nasofaring

Variabel	Uji	<i>p</i>
Skor Histopatologi Epitel Mukosa Nasofaring	Wallis	0,041

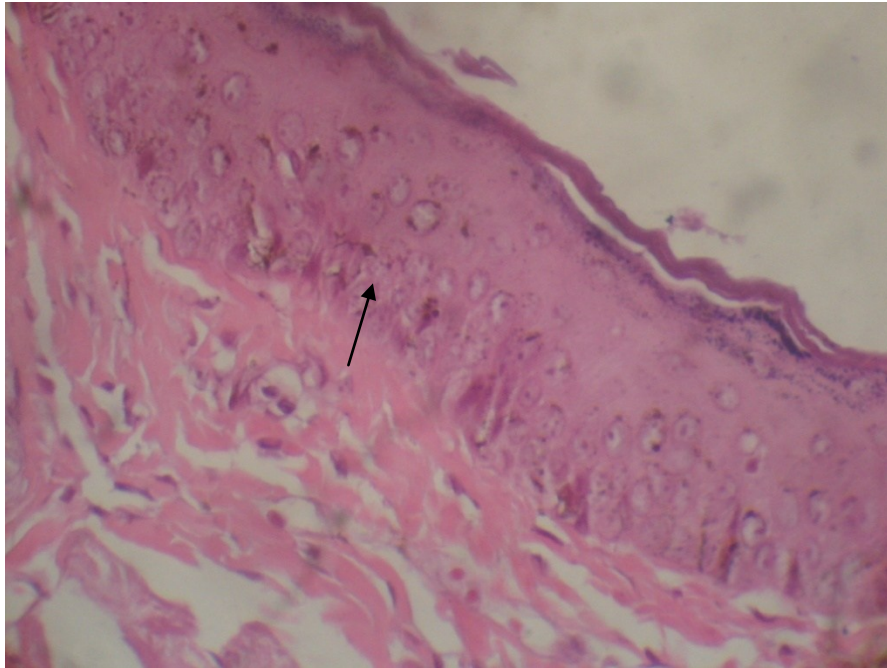
Uji Kruskal-Wallis terhadap variabel skor histopatologi epitel nasofaring dalam kelompokperlakuandiperoleh ($p=0,041$) atau terdapat perbedaan bermakna ($p<0,05$).

Tabel 11. Uji Post Hoc Mann Whitney Skor Histopatologi Epitel Mukosa Nasofaring

Kelompok	Uji	<i>p</i>
Kretek biasa dibanding <i>divine</i> kretek selama induksi <i>formaldehyde</i> (K1-P1)	Mann-Whitney	0,014*
<i>Divine</i> kretek selama induksi dibanding <i>divine</i> kretek sesudah induksi <i>formaldehyde</i> (P1-P2)	Mann-Whitney	1
Kretek biasa selama induksi dibanding kretek biasa sesudah induksi <i>formaldehyde</i> (K1-K2)	Mann-Whitney	0,05
Kretek biasa sesudah induksi dibanding <i>divine</i> kretek sesudah induksi <i>formaldehyde</i> (K2-P2)	Mann-Whitney	0,513

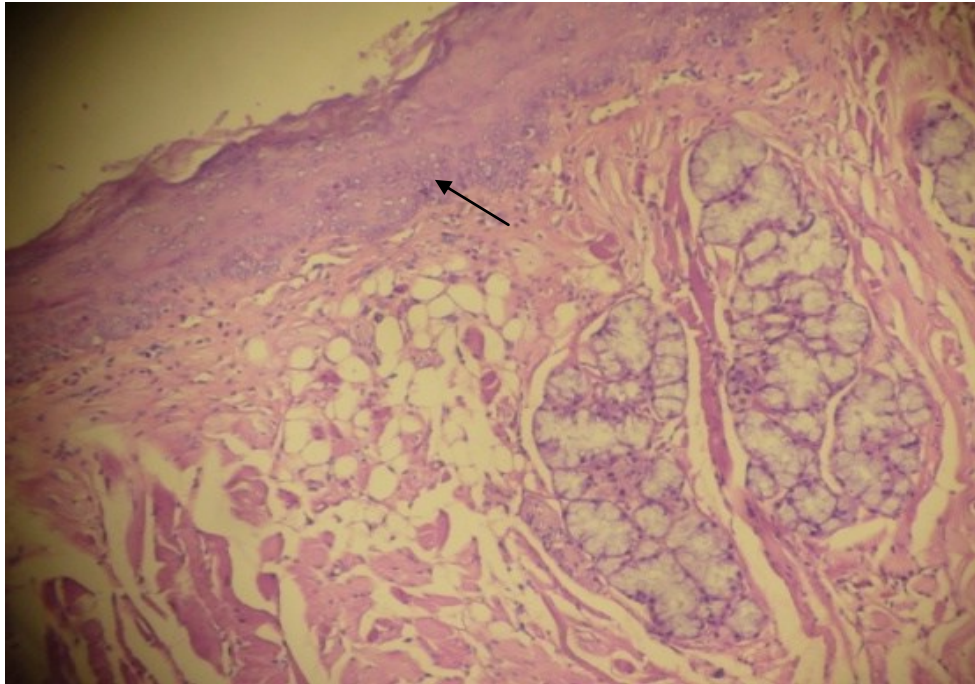
Keterangan : * : Berbeda Bermakna ($p < 0,05$)

Uji Mann-Whitney antara kelompok yang mendapat paparan asap rokok kretek biasa selama induksi *formaldehyde* (K1) dan kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* (P1) adalah ($p=0,014$) atau terdapat perbedaan bermakna, sedangkan hasil uji Mann Whitney antara kelompok – kelompok yang lain tidak berbeda ($p>0,05$).



Gambar 7. Epitel Nasofaring Normal (HE 400X, skor 1)

Gambar 7. Epitel nasofaring normal. Tampak proliferasi sel masih dalam batas normal. Tidak tampak adanya hiperplasia atau displasia.



Gambar 8. Epitel Nasofaring Displasia Ringan (HE 400X, skor 4)

Gambar 8. Epitel nasofaring displasia ringan. Tampak penebalan pada epitel mukosa, silia menghilang dan adanya proliferasi atau hiperplasia dari lamina basalis dan parabasal yang tidak melebihi sepertiga epitel (tanda panah).

BAB 6

PEMBAHASAN

Divine kretek merupakan salah satu inovasi dalam bidang ilmu pengetahuan dan teknologi. Dalam *divine* kretek terkandung blok molekul besar (nanostruktur) yang memiliki elektron berdensitas tinggi yang dapat menangkap radikal bebas dan mendonasi elektron di dalam tubuh.¹⁵ Nanostruktur ini memiliki struktur yang stabil dan dapat memicu proses penangkapan ion Hg pada nikotin. Sifat nanostruktur ini membuat *divine* kretek dapat mengeliminasi toksisitas Hg yang terkandung dalam asap rokok.¹³

Dalam pembuatan *divine* kretek, ditambahkan suatu bahan kimia sebagai *scavenger* (pembawa radikal bebas dalam tubuh) yang merupakan senyawa aromatik dengan struktur yang kompleks. Struktur kompleks ini kaya akan elektron berdensitas tinggi sehingga memiliki energi potensial yang juga cukup tinggi untuk mentransfer elektron.³⁰ Karena kandungan energi potensial dan *scavengernya* ini maka *divine* kretek diharapkan dapat memberi energi dan elektron pada sel-sel nasofaring yang sakit kemudian mendorong dan mengoptimalkan diri sel sehat serta dapat menetralkan, mengikat, dan membuang radikal bebas dari dalam tubuh.¹⁴

Penelitian ini dilakukan dengan menginduksi *formaldehyde* pada mencit C3H melalui uap formalin 20% dan diet formalin 10% sehingga diharapkan timbul proses karsinogenesis nasofaring pada mencit C3H tersebut. Sebagai intervensi diberikan *divine* kretek dan rokok kretek biasa dalam bentuk paparan

asap. Adanya kelompok kontrol (K1 dan K2) yang diberikan paparan asap rokok kretek biasa dalam penelitian ini bertujuan untuk menganalisa apakah rokok kretek biasa atau *divine* kretek yang memiliki efek preventif dan kuratif. Pemberian paparan asap rokok kretek biasa pada kelompok K1 dan juga *divine* kretek pada kelompok P1 selama 18 minggu bertujuan untuk membuktikan efek preventif dari salah satu atau keduanya, sedangkan pemberian paparan asap rokok kretek biasa pada kelompok K2 dan *divine* kretek pada kelompok P2 selama 9 minggu kedua bertujuan untuk membuktikan efek kuratif dari salah satu atau keduanya. Efek preventif atau kuratif dari *divine* kretek dapat dilihat dari indeks apoptosis dan perubahan histopatologi epitel mukosa nasofaring dimana indeks apoptosis akan menjadi lebih tinggi dan perubahan histopatologi akan terlihat lebih baik.

Apoptosis adalah suatu kematian sel yang terprogram.¹⁶ Dalam keadaan transformasi keganasan, sel yang mengalami transformasi tersebut tidak lagi mampu disingkirkan melalui mekanisme apoptosis sehingga terjadi resistensi apoptosis.³⁴ Hal ini menjadi salah satu mekanisme preventif yang diharapkan dari *divine* kretek yaitu melalui peningkatan apoptosis. Apoptosis yang terjadi pada sel tumor dapat dinilai melalui indeks apoptosis.¹⁶

Berdasarkan penelitian dan juga teori yang telah ada, badan apoptosis hanya dapat dilihat pada sel kanker.¹⁶ Penelitian Fitriani Lumongga menyebutkan bahwa apoptosis terjadi karena adanya mutasi gen P53 yang merupakan tumor suppressor gen. Fungsi dari gen P53 ini adalah untuk mencegah terjadinya replikasi sel pada sel yang rusak secara genetik melalui penghentian siklus sel pada fase G1 atau

interfase. Gen ini juga berfungsi untuk mencetuskan apoptosis bila kerusakan sel cukup luas dan terjadi kegagalan pada repair.³⁵ Hidayat Sulistyio dalam penelitiannya menyebutkan bahwa apoptosis hanya terjadi pada tahap displasia berat.³ Namun, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perubahan histopatologi yang terjadi hanya mencapai displasia ringan sehingga untuk perhitungan indeks apoptosis belum dapat dilakukan. Salah satu penyebab mengapa karsinogenesis dalam penelitian ini belum mencapai displasia berat adalah adanya kesalahan teknis yaitu tidak dapat dipastikannya dosis *formaldehyde* dalam kadar ppm karena keterbatasan alat dimana seharusnya kadar *formaldehyde* dalam udara adalah 10 ppm.³⁶ Untuk melihat perbedaan makna serta efek preventif dan kuratif dari *divine* kretek dapat dilihat dari skor perubahan histopatologi.

Dari hasil didapatkan adanya perbedaan bermakna skor histopatologi pada kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* (P1) dan kelompok K1. Skor histopatologi pada kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* (P1) lebih baik daripada kelompok yang mendapat paparan asap rokok kretek biasa selama induksi *formaldehyde* (K1). Adanya perbedaan bermakna antara kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* (P1) dan kelompok yang mendapat paparan asap rokok kretek biasa selama induksi *formaldehyde* (K1) ini menunjukkan bahwa terdapat efek inhibisi proses karsinogenesis nasofaring dalam *divine* kretek. Hal ini juga menunjukkan bahwa efek preventif *divine* kretek lebih baik daripada efek kuratifnya. Efek preventif *divine* kretek ini berhubungan dengan adanya *scavenger* (pembawa radikal bebas

dalam tubuh). Scavenger ini dapat menangkap dan mengeliminasi radikal bebas dalam rokok seperti NO, NO₂, HCN, CO, dan CO₂ sehingga ia dapat mencegah terjadinya kanker dalam tubuh manusia.¹⁴

Sementara itu uji Mann Whitney pada kelompok yang mendapat paparan asap rokok kretek biasa setelah induksi *formaldehyde* (K2) dan kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek setelah induksi *formaldehyde* (P2) menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada skor histopatologi pada kelompok perlakuan rokok kretek biasa dan *divine* kretek. Hal ini menunjukkan bahwa *divine* kretek tidak memiliki efek kuratif dalam terapi KNF.

Uji Mann Whitney pada kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* (P1) dan kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek setelah induksi *formaldehyde* (P2) menunjukkan hasil yang tidak berbeda. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa paparan asap *divine* kretek berpotensi sebagai anti displasia dimana potensi preventif *divine* kretek diperankan oleh *scavanger* yang merupakan asam amino dalam bentuk partikel nano (dalam penelitian ini digunakan metionin dan fenilalanin) yang dapat menangkap radikal bebas yang dihasilkan oleh *formaldehyde*.

Perbedaan skor histopatologi yang ekstrim terjadi pada kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* (P1), kelompok yang mendapat paparan asap *divine* kretek setelah induksi *formaldehyde* (P2), dan kelompok yang mendapat paparan asap rokok kretek biasa setelah induksi *formaldehyde* (K2) dimana skor histopatologi epitel mukosa nasofaring mencit C3H di ketiga kelompok tersebut sangat berbeda jauh yaitu

normal dan displasia ringan. Perbedaan yang mencolok ini disebabkan karena perlakuan kurang cermat sehingga dalam 1 kelompok terdapat mencit yang terlalu sedikit atau terlalu banyak memakan makanan yang telah dicampur formalin.

Skor histopatologi dalam penelitian ini tidak dapat mencapai tahap displasia berat seperti pada penelitian sebelumnya sehingga keterbatasan penelitian ini adalah; 1) dosis induksi karsinogenesis nasofaring tidak dapat dipastikan karena keterbatasan alat, 2) keganasan nasofaring *difossa rosenmuller* pada mencit tidak bisa dilokalisasi secara akurat, 3) studi ini tidak memperlihatkan mekanisme kerja dari asap *divine* kretek secara lengkap.

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1. Simpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah :

1. Pemberian paparan asap *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* dapat memperbaiki skor perubahan histopatologi pada karsinogenesis nasofaring mencit C3H.
2. Pemberian paparan asap *divine* kretek sesudah induksi *formaldehyde* tidak dapat memperbaiki skor perubahan histopatologi pada karsinogenesis nasofaring mencit C3H.
3. Efek preventif pada *divine* kretek lebih kuat daripada efek kuratifnya.

7.2. Saran

Untuk penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan pemeriksaan lebih lanjut mengenai kandungan asap *divine* kretek dan mekanisme kerja dari asap *divine* kretek secara lengkap. Selain itu perlu diperhitungkan secara tepat konsentrasi *formaldehyde* dengan menggunakan formaldehydometer agar karsinogenesis sampai ke tahap displasia berat. Dosis asap *divine* kretek dalam udara (dengan satuan ppm) juga perlu diperhitungkan agar hasil penelitian menjadi lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dubrulle F, Souillard R, Hermans R. 2007. Extension patterns of nasopharyngeal carcinoma. *Eur Radiol* [serial online]. 2007 [cited 2011 July 26]. 17 : 2622 – 2630. Available from : <http://www.springerlink.com/content/gq06g75623714522/>
2. Kominfo Jatimprov. Pria rentan terkena kanker nasofaring [homepage on the internet]. c2010 [updated 2010 April 12; cited 2010 July 26]. Available from : <http://kominfo.jatimprov.go.id/watch.php?id=21396&k=1>
3. Sulisty H. Inhibisi aktivitas proliferasi sel dan perubahan histopatologi epitelial mukosa nasofaring mencit C3H dengan pemberian ekstrak benalu teh [Master Thesis]. Semarang : Universitas Diponegoro; 2010 [cited 2011 July 25]. Available from : http://eprints.undip.ac.id/24718/1/HIDAYAT_SULISTYO.pdf
4. Lo K, Huang D. Genetic and epigenetic changes in nasopharyngeal carcinoma. *CANCER BIOLOGY* [serial online]. 2002 [cited 2011 November 11]. 12(2) : 451–462. Available from : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X02000883>
5. Polesel J, Franceschi S, Talamini R, Negri E, Barzan L, Montella M, et. al. Tobacco smoking, alcohol drinking, and the risk of different histological types of nasopharyngeal cancer in a low-risk population. *Oral Oncology Journal* [serial online]. 2011 [cited 2011 April 7]. 47 : 541-545. Available

from :

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368837511001138>

6. Arditawati Y. Analisis hubungan antara faktor risiko dengan tipe histopatologi pada KNF. Semarang : Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro; 2011.
7. Wiliyanto O. Insidensi kanker kepala leher berdasarkan diagnosis patologi anatomi di RS dr Kariadi Semarang periode 1 Januari 2001–31 Desember 2005. 2006 [cited 2011 Desember 2]. Available from : <http://eprints.undip.ac.id/20998/1/Onggo.pdf>
8. Conolly RB, Kimbel JS, Janszen D, Schlosser MP, Kalisak D, Preston J, et. al. Biologically motivated computational of Formaldehydecarcinogenicity in the F344 rat. Toxicological Sciences [serial online]. 2003 [cited 2012 February 3] ; 75 : 432 – 447. Available from : <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/75/2/432.full.pdf>
9. Sayed I. Nanotechnology in Head and neck cancer : the race is on. Curr Oncol Rep [serial online]. 2010 [cited 2011 July 27]. 12 : 121-128. Available from : <http://www.springerlink.com/content/61m30v1t447h4451/>
10. Nussinov R. Nanobiology: from physics and engineering to biology. IOP Science [serial on the Internet]. 2006 [cited 2011 July 22]; 3. Available from : <http://iopscience.iop.org/1478-3975/3/1/E01>
11. Sumitro BS. *Divine* kretek Innovation of cigarette smoke particulates in regard to reduce harm and gain health outcome. Smartbio [serial on the Internet]. 2011 [cited 2011 July 26]. Available from : smartbio.org

12. Saraswati. Upaya penanganan berbagai penyakit akibat radikal bebas dengan balur-*divine* kretek. Sehari Konsep Sehat Sakit dari Sudut Pandang Nanobiologi; 2011 July 23; Semarang.
13. Sumitro BS. *Divinetobacco*, a technology for kretek conservation. Smartbio [serial on the Internet]. 2010 [cited 2011 September 15]. Available from : smartbio.org
14. Sarjadi. Kompleksitas sistem sel. Seminar Sehari Konsep Sehat Sakit dari Sudut Pandang Nanobiologi; 2011 July 23; Semarang.
15. Sumitro BS, Zahar G. Overcoming cigarette for health without altering the flavor (brief illustration of scientific background and evidences). 2011 [cited 2011 September 15]. Available from : http://smartbio.ub.ac.id/web/images/slide/Research_of_Divine_Cigarette.pdf
16. Purnama AA. Pengaruh pemberian *echinacea purpurea* terhadap produksi ifn- γ dan indeks apoptosis sel tumor mencit dengan kanker payudara yang mengalami stress [Master Thesis]. Semarang : Universitas Diponegoro ; 2008 [cited 2012 January 25]. Available from : http://eprints.undip.ac.id/16004/1/A_Agung_Purnama.pdf
17. Brennan B. Nasopharyngeal carcinoma. Orphanet Journal of Rare Disease [serial online]. 2006 [cited 2011 July 27]; 1(23) : 1750. Available from : <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-NPC.pdf>
18. Tanuyuttwongese C, Mutiarangura A, Porthanakasem W, Kerkhanjanarong V, Sriuranphong V. Genomic alterations in nasopharyngeal carcinoma; loss

- of heterozygosity an epstein barr virus infection. Br. J Cancer 1997; 76: 770-776
19. Mimi C. Yu, Yuan J. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. CANCER BIOLOGY [serial online]. 2002 [cited 2011 November 30];12:421–429. Available from : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X02000858>
 20. Guol X, Randall C, Johnson, Deng H, Liao J, Guan L, et al. Evaluation of nonviral risk factors for nasopharyngeal carcinoma in a high-risk population of Southern China. Int. J. Cancer [serial online]. 2009 [cited 2011 July 29]; 124 : 2942 – 2947. Available from : <http://www.urucan.org.uy/iah/toc/1486/2009/1486-20090600-12-22.pdf>
 21. Harahap MP. Ekspresi Vascular endothelial growth factor pada karsinoma nasofaring [Master Thesis]. Medan : Universitas Sumatera Utara; 2009 [cited 2011 November 25]. Available from : <http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/6425/1/09E00716.pdf>
 22. Soepardi EA, Iskandar N, Bashiruddin J, Restuti RD. Buku Ajar Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Kepala & Leher. Jakarta : Balai Penerbit FK UI ; 2007.
 23. WHO. Pathology and Genetics head and neck tumours [homepage on the Internet]. 2005 [cited 2012 February 3]. Available from: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb9/BB9.pdf>

24. American Cancer Society. Nasopharyngeal cancer [homepage on the Internet]. c2011 [cited 2011 July 19]. Available from : www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003124-df.pdf
25. National Cancer Institute. Formaldehyde and cancer risk [homepage on the Internet]. c2011 [updated 2011 Oktober 6 ; cited 2011 July 29]. Available from : http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/Fs3_8.pdf
26. Alberta Environment. Assessment report on formaldehyde for developing ambient air quality objectives [homepage on the Internet]. c2006 [cited 2011 September 9]. Available from : <http://environment.gov.ab.ca/info/library/7903.pdf>
27. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition [serial online]. 2002 [cited 2011 September 9]; 18 : 872- 879. Available from : <http://www.sassit.co.za/Journals/Physiology/Nutrition/antioxidants/free%20radicals,%20antioxidants%20and%20nutrition.pdf>
28. Harvie J. Eliminating mercury use in hospital laboratories : A Step Toward Zero Discharge. Public Health Reports [serial online]. 1999 [cited 2012 February 3] ; 114 : 353 – 358. Available from : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1308496/pdf/pubhealthrep00026-0063.pdf>
29. Sumitro BS. Pengembangan pemahaman holistic sistem kehidupan melalui pendekatan complexity science dan biologi. Smartbio [serial on the Internet]. 2011 [cited 2011 September 15]. Available from :

<http://smartbio.org/files/pemahaman%20holistic%20sistem%20kehidupan%20melalui.pdf>

30. Zahar G. The balur and *divine* kretek therapy. Smartbio [serial on the internet]. 2011 [cited 2011 September 15]. Available from: <http://smartbio.org/files/The%20Balur%20and%20Divine%20Kretek%20Therapy.pdf>
31. Widjaja N. Pengaruh *alpinia galanga* (lengkuas) terhadap aktivitas proliferasi sel dan indeks apoptosis pada adenokarsinoma mamma mencit C3H [Master Thesis]. Semarang : Universitas Diponegoro; 2009 [cited 2012 January 23]. Available from : http://eprints.undip.ac.id/24719/1/Nani_Widjaja_Budi_Hartono.pdf
32. Apoptosis [homepage on the internet]. c2012 [updated 2012 July 31; cited 2012 August 5]. Available from : http://www.google.co.id/imgres?q=apoptotic+body&hl=id&sa=X&biw=1280&bih=685&tbn=isch&prmd=imvns&tbnid=XLDSuP2v3vesUM:&imgrefurl=http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis&docid=sUnZrHNh_vLkdM&imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/
33. Immunologie II. Cellular and molecular immunology abbas lichtman pillai 5th ed. c2005 [cited 2012 February 10]. Available from : http://www.immunology.unibe.ch/wiki/Files/VL_ImmuII_Ch1+2_Fall09_BE.pdf
34. Asri A. Pengaruh pemberian perasan seledri terhadap aktivitas proliferasi sel, indeks apoptosis dan perubahan histopatologi mukosa kolon wistar

- [Master Thesis]. Semarang : Universitas Diponegoro; 2004 [cited 2012 July 24]. Available from : <http://eprints.undip.ac.id/12346/1/2004MIB3805.pdf>
35. Lumongga F. Apoptosis [Master Thesis]. Medan : Universitas Sumatera Utara; 2008 [cited 2012 July 24]. Available from :<http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/2061/1/09E01457.pdf>
36. Health and Safety Executive. The carcinogenicity of formaldehyde[homepage on the Internet]. 2004 [cited 2012 January 30]. Available from: <http://www.hse.gov.uk/aboutus/meetings/iacs/acts/watch/130105/p6annex2.pdf>

Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian



Mencit C3H



Proses penyuntikan asap rokok ke arah anus



Proses pengasapan mencit dengan asap rokok



uit yang telah dipenuhi asap



Larutan RDE yang mengandung asam amino dalam bentuk partikel nano



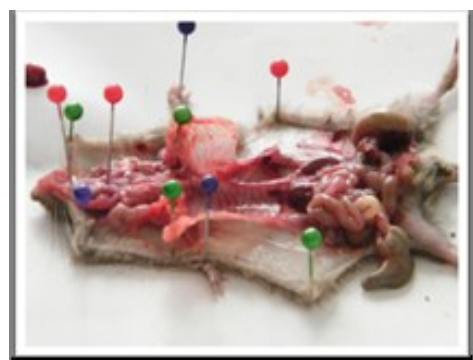
Kiri: kretek biasa
Kanan: kretek yang telah diolesi RDE



Sprit, selang, pipa rokok, dan rokok yang telah dihubungkan



Proses pengambilan nasofaring mencit



Proses pengambilan nasofaring mencit

Lampiran 2. Ethical Clearance

	<p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO DAN RSUP dr KARIADI SEMARANG Sekretariat : Kantor Dekanat FK Undip Lt.3 Jl. Dr. Soetomo 18. Semarang Telp.024-8311523/Fax. 024-8446905</p>										
<p>ETHICAL CLEARANCE No. 022/EC/FK/RSDK/2012</p> <p>Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP. Dr. Kariadi Semarang, setelah membaca dan menelaah USULAN Penelitian dengan judul :</p> <p style="text-align: center;">UJI PAPARAN DIVINE KRETEK TERHADAP KARSINOGENESIS NASOFARING : STUDI EKSPERIMENTAL LABORATORIK PADA MENCIT C3H YANG DIINDUKSI FORMALDEHYDE</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 30%;">Peneliti Utama</td> <td style="width: 10%;">:</td> <td style="width: 60%;">Risa Ardiani</td> </tr> <tr> <td>Anggota Peneliti</td> <td>:</td> <td>Niken Maretasari Putri A. Widi Lestari</td> </tr> <tr> <td>Penelitian</td> <td>:</td> <td>Dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang</td> </tr> </table> <p>Setuju untuk dilaksanakan, dengan memperhatikan prinsip-prinsip yang dinyatakan dalam Deklarasi Helsinki 1975, dan Pedoman Nasional Etik Penelitian Kesehatan (PNEPK) Departemen Kesehatan RI 2004.</p> <p>Pada laporan akhir peneliti harus melampirkan cara pemeliharaan & dekapitasi hewan coba.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">Fakultas Kedokteran Undip Dekan</p> <div style="text-align: center;">  dr. Endang Ambarwati, Sp.KFR NIP. 19560806 198503 2 001 </div> </div> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">Semarang, 15 Februari 2012 Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Undip/RS. Dr. Kariadi Ketua</p> <div style="text-align: center;">  Prof. Dr. dr. Tjahjono, Sp PA(K),FIAC NIP. 19450514 197308 1 001 </div> </div> </div>			Peneliti Utama	:	Risa Ardiani	Anggota Peneliti	:	Niken Maretasari Putri A. Widi Lestari	Penelitian	:	Dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang
Peneliti Utama	:	Risa Ardiani									
Anggota Peneliti	:	Niken Maretasari Putri A. Widi Lestari									
Penelitian	:	Dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang									

Lampiran 3. Output SPSS

1. Dilakukan uji Kruskal Wallis, dan uji post hoc Mann Whitney.

Ranks		N	Mean Rank
Histopatologi Karsinogenes	K1	5	16.00
	K2	5	10.00
	P1	5	8.00
	P2	5	8.00
	Total	20	

Test Statistics ^{a,b}	
	Histopatologi Karsinogenes
Chi-Square	8.253
Df	3
Asymp. Sig.	.041

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

Mann-Whitney Test

Ranks		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopatologi Karsinogenes	K1	5	7.50	37.50
	P1	5	3.50	17.50
	Total	10		

Test Statistics^b

	Histopatologi Karsinogenes
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	17.500
Z	-2.449
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

Ranks

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopatologi Karsinogenes K2	5	6.00	30.00
P2	5	5.00	25.00
Total	10		

Test Statistics^b

	Histopatologi Karsinogenes
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

Ranks

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Histopatologi Karsinogenes P1	5	5.50	27.50
P2	5	5.50	27.50
Total	10		

Test Statistics^b

	Histopatologi Karsinogenes
Mann-Whitney U	12.500
Wilcoxon W	27.500
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

2. Nilai mean dan median

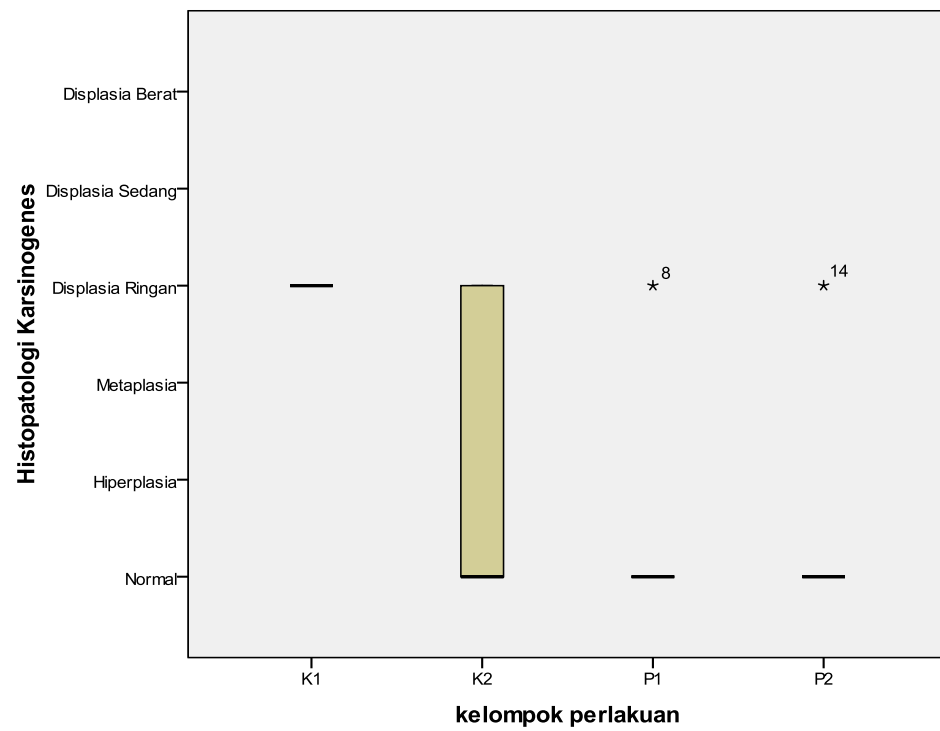
Test Statistics^b

	Histopatologi Karsinogenes
Mann-Whitney U	12.500
Wilcoxon W	27.500
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok perlakuan

3. Grafik Boxplot



Lampiran 4. Biodata Mahasiswa

Identitas

Nama : Niken Maretasari Putri Atmodjo
 NIM : G2A008124
 Tempat/tanggal lahir : Purworejo/22 Maret 1990
 Jenis kelamin : Perempuan
 Alamat : Jalan Gergaji IV/1119, Semarang
 Nomor HP : 085742391119
 e-mail : faithfulcatlovers@yahoo.co.id

Riwayat Pendidikan Formal

1. SD : SDN 1 Purworejo. Lulus tahun: 2002
2. SMP : SMP N 2 Purworejo. Lulus tahun: 2005
3. SMA : SMA N 1 Purworejo Lulus tahun: 2008
4. FK UNDIP : Masuk tahun : 2008

Keanggotaan Organisasi

BEM KU Bidang Departemen Luar Negeri UNDIP Tahun 2009 s/d 2010

Pengalaman mengikuti lomba karya ilmiah

Risa Ardiani, Niken Maretasari P.A, Widi Lestari. Uji Paparan *Divine* kretek Terhadap Karsinogenesis Nasofaring: Studi Eksperimental Laboratorik pada Mencit C3H yang Diinduksi *Formaldehyde*. DIKTI. Lolos PKM-P untuk didanai 2012.